

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 641 524**

51 Int. Cl.:

G01N 15/14 (2006.01)
B03C 5/00 (2006.01)
B03C 5/02 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
C12M 1/32 (2006.01)
C12M 1/34 (2006.01)
B01L 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.12.2011 PCT/EP2011/071819**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **07.06.2012 WO12072822**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.12.2011 E 11813674 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.06.2017 EP 2646798**

54 Título: **Microanálisis de la función celular**

30 Prioridad:

03.12.2010 US 419377 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.11.2017

73 Titular/es:

**CELLPLY S.R.L. (100.0%)
Via Fondazza, 53
40125 Bologna, IT**

72 Inventor/es:

**BOCCHI, MASSIMO y
GUERRIERI, ROBERTO**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 641 524 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Microanálisis de la función celular

- 5 Esta patente se refiere a un método y a un aparato para producir agregados de partículas como se divulga en las reivindicaciones adjuntas.

Antecedentes de la invención

- 10 Se necesitan sistemas que proporcionen un alto rendimiento y un análisis eficiente de las partículas biológicas, incluyendo células vivas individuales, para permitir una identificación rápida y valiosa de partículas, incluidas células, moléculas y similares, que poseen funciones deseadas, por ejemplo, que producen o inducen un resultado biológico deseado. Dichos sistemas son necesarios para descubrimiento de fármacos, diagnóstico, selección de moléculas candidatas y similares. En un sistema preferente, la partícula se retiene en una forma viable y no resulta dañada
15 significativamente por el proceso analítico.

- Los sistemas actuales que evalúan partículas individuales utilizan en general la dielectroforesis (DEF) para manipular las partículas. El campo eléctrico impuesto a partículas tales como células para levitar y mantener la posición de la partícula durante reacciones inducidas y análisis puede dañar la viabilidad y perturbar la capacidad de
20 la partícula para funcionar adecuadamente. Bajo uso prolongado, por ejemplo, dicho daño puede conducir a lisis y/o muerte celular. La fijación de partículas a un sustrato, electrodo o pared de una cámara también puede requerir la lisis de la célula para eliminarla del sistema después del análisis o para capturar productos celulares.

- Sería muy útil proporcionar un sistema rápido y de alto rendimiento para capturar, identificar y analizar de forma eficaz y eficiente la función biológica de partículas individuales, en el que las partículas no resulten dañadas significativamente por el sistema. El documento US 2009/0288963 divulga un sistema y un método para producir
25 líneas celulares en la interfaz fluido/atmósfera de micropocillos invertidos.

Sumario de la invención

- 30 En el presente documento se divulga un sistema, dispositivo y métodos de uso de micropocillos abiertos invertidos que proporcionan una selección y clasificación rápidas y eficientes de partículas y, particularmente, de partículas individuales, incluyendo células individuales. Dicha selección incluye el análisis de características particulares de la partícula, así como de propiedades funcionales de la partícula que pueden indicar si una partícula o reactivo puede ser terapéuticamente útil. Por ejemplo, las características de la partícula pueden incluir: presencia y cantidad relativa de unión a y/o afinidad específica por ligandos, tales como antígenos diana de células cancerosas; reacciones de unión e interacciones entre células, por ejemplo, lisis, toxicidad, producción de biomarcadores, electroporación y similares; respuesta y/o reacciones celulares inducidas, por ejemplo, inducidas por otras células, fármacos, compuestos, proteínas, anticuerpos, moléculas, enzimas, moléculas de ácido nucleico, secreciones celulares y similares; producción inducida de productos celulares, por ejemplo, enzimas líticas, anticuerpos, biomarcadores y similares. El análisis de estas características, seguido de la recuperación de partículas, apoya métodos para la clasificación de células funcionales que conduce al aislamiento de células o de sus subproductos, tales como moléculas secretadas, que tienen una función y utilidad probadas, por ejemplo, utilidad terapéutica.

- 45 En un modo de realización, el análisis de células individuales puede incluir una pluralidad de pruebas, en sustancialmente un esquema de reacción o secuencialmente, por ejemplo, con los resultados de una prueba proporcionando información para la prueba particular a seguir. Por ejemplo, una célula conocida por estar asociada a una enfermedad específica, por ejemplo, una célula obtenida de un individuo que sufre la enfermedad, se puede analizar en el sistema para evaluar la presencia de un biomarcador particular, por ejemplo, un antígeno, una proteína expresada o una característica de la enfermedad. Después de un análisis preliminar para identificar si la célula individual muestra el biomarcador, la misma célula identificada se puede analizar nuevamente para evaluar su respuesta a un fármaco terapéutico candidato, compuesto u otro tratamiento celular que se espera que induzca de manera eficaz una respuesta deseada en células que exhiben el biomarcador examinado.

- 55 El análisis en el micropocillo abierto invertido se puede llevar a cabo sobre una partícula individual, incluyendo una célula individual, con sincronización rápida y eficaz, y sin necesidad de aislar las partículas o productos de las partículas de mezclas complejas. Los métodos de selección incluyen la selección de una célula individual para evaluar propiedades funcionales, con la opción de recuperar una célula original en forma sustancialmente viable, para análisis continuo, inmortalización y/o expansión clonal identificados por tener una propiedad útil. Los componentes celulares, tales como ADN, ARN, proteínas y similares, también se pueden aislar de la célula original.
60

- Los métodos permiten la identificación de reacciones e interacciones de partículas que son deseables de manera temprana en el proceso de desarrollo. Una comprensión temprana de la función celular permite el desarrollo final de materiales biológicos útiles con una mejor comprensión del potencial de éxito del material y puede reducir el número de posibles candidatos en una etapa anterior del proceso de desarrollo. Se pueden realizar métodos para realizar análisis múltiples y rápidos sobre la misma partícula, por ejemplo sobre una célula individual, permitiendo un avance
65

más rápido en el proceso de descubrimiento.

El sistema de micropocillos abiertos invertidos descrito en el presente documento facilita el suministro o la exclusión precisa de células individuales a los micropocillos, y la manipulación precisa de células y otras partículas en el microcanal y en un micropocillo específico, el suministro de reactivos, tampones, marcadores y similares, incluyendo otras células para interacciones célula-célula. Se pueden evaluar múltiples características de las células individuales, conservando la vitalidad en el micropocillo abierto para realizar pruebas opcionales continuas, inmortalización, expansión y similares. La recuperación de las partículas, incluida la recuperación de la célula individual original, es posible en un corto espacio de tiempo, usando cantidades mínimas de reactivos y recuperando células y productos en una condición sustancialmente viable y útil. En particular, la deposición de una o más partículas, incluyendo células vivas en la interfaz fluido/aire de un micropocillo abierto, permite interacciones precisas partícula-partícula que se pueden monitorizar eficientemente y examinar rápidamente para identificar partículas candidatas, por ejemplo, células, para análisis continuo y/o expansión clonal en el micropocillo.

Sorprendentemente, el fluido que llena el micropocillo abierto invertido 102 que tiene un extremo inferior 108 abierto al aire, se retiene sin fugas desde el extremo inferior abierto cuando se utilizan restricciones geométricas y condiciones de fluido adecuadas. Además, la o las partículas depositadas 128 quedan sorprendentemente retenidas en el menisco 122 durante los lavados con fluidos, la colocación de partículas adicionales en estrecha proximidad con la primera y procedimientos analíticos. El micropocillo abierto actúa como una "mini-centrífuga" que permite el suministro de reactivos a la partícula o partículas depositadas para un análisis rápido, lavados y análisis continuo de la partícula depositada sin que se produzcan pérdidas. Las células que están dentro del micropocillo conservan una buena viabilidad, por ejemplo, después del análisis y cuando se recuperan del micropocillo. La recuperación de los micropocillos se puede realizar, por ejemplo, sobre sustratos tales como placas de microvaloración, por ejemplo, para inmortalización y/o expansión. En un modo de realización, las células individuales seleccionadas se pueden incubar y expandir dentro del micropocillo.

La invención proporciona métodos y estructuras que implementan un sistema de micropocillos abiertos invertidos que comprende un micropocillo abierto en un extremo superior a un microcanal. El micropocillo está abierto en un extremo inferior a la atmósfera en el exterior del dispositivo, por ejemplo, al aire u otro gas.

El suministro de una o más partículas a un micropocillo se puede realizar por sedimentación, por ejemplo, controlada por densidad celular, velocidad del fluido, tiempo de carga y, opcionalmente, fuerzas dielectroforéticas. Las fuerzas dielectroforéticas pueden ser generadas por electrodos conectados a voltajes alternos apropiados y posicionados en un microcanal, colocándose el microcanal sobre el micropocillo que está abierto y en comunicación de fluido con el microcanal. También se proporcionan métodos para la focalización eficiente de partículas y para interacciones eficientes de las partículas, controladas, por ejemplo, por electrodos incrustados en el micropocillo abierto para crear fuerzas dielectroforéticas capaces de manipular partículas, tales como células individuales, hasta una posición deseada dentro del micropocillo. Dichos métodos proporcionan un sistema analítico de alto rendimiento que utiliza cantidades mínimas de reactivos y que permite la recuperación a alto rendimiento de partículas viables después del análisis, incluyendo células y productos celulares.

La invención proporciona además métodos y estructuras para guiar y clasificar partículas, incluidas células y partículas no celulares, con precisión, con el fin de suministrar una partícula de manera eficiente a un micropocillo del sistema de micropocillos abiertos invertidos. Modos de realización específicos incluyen la disposición de electrodos y pares de electrodos en el microcanal para permitir el movimiento de partículas con escaso o ningún daño a la vitalidad de los materiales biológicos, tales como células; la disposición de electrodos y pares de electrodos en el microcanal y en las proximidades del micropocillo, estructuras que permiten el acceso controlado de las partículas deseadas al micropocillo y que cierran efectivamente el micropocillo y repelen las partículas no deseadas; y un patrón de electrodos y pares de electrodos dentro del micropocillo para detectar y opcionalmente controlar la posición de una partícula a medida que pasa a través del micropocillo, por ejemplo, para la deposición en el menisco del fluido.

El sistema de micropocillos abiertos invertidos incluye una (figura 1) o una pluralidad (figura 3) de micropocillos, en el que cada micropocillo está en comunicación de fluido con uno o con una pluralidad de microcanales para el suministro de fluido y de partículas a los micropocillos. El microcanal está dispuesto, en general, por encima del micropocillo, estando el micropocillo abierto al microcanal de fluido en un extremo superior 106 del micropocillo y abierto en un extremo inferior 108 a la atmósfera en el exterior del dispositivo, por ejemplo, al aire u otro gas, cuyas propiedades tales como composición de gases, humedad, temperatura y ausencia de contaminantes se pueden controlar. El micropocillo tiene un eje vertical 110, por ejemplo, un eje vertical central, que se extiende entre el extremo superior 106 y el extremo inferior 108 del micropocillo 102.

En un modo de realización, la pared vertical 112 del micropocillo 102 está formada al menos en parte por un material dieléctrico 114. La pared vertical también puede estar formada al menos en parte por uno o más electrodos integrados con un material dieléctrico, por ejemplo, en una configuración de laminado que es perpendicular al eje vertical del pocillo, estando el laminado formando el micropocillo, por ejemplo, como se muestra en la figura 2.

Un fluido insertado en el microcanal 104 llena el micropocillo 102 por acción capilar, mientras que la tensión superficial mantiene el fluido dentro del micropocillo abierto, formando un menisco 122 en el extremo abierto inferior 108 del micropocillo en la interfaz aire-fluido. La superficie del microcanal y del micropocillo se puede recubrir con materiales hidrófilos o hidrófobos opuestos. Por ejemplo, el micropocillo puede tener un recubrimiento hidrófilo y la superficie del microcanal cerca del extremo abierto del micropocillo tiene un recubrimiento hidrófobo, o viceversa.

En general, el movimiento de partículas dentro del microcanal y la colocación de una partícula en un micropocillo particular se logran limitando la dilución, la sedimentación, las fuerzas electromagnéticas, la gravedad y una combinación de éstas. En un modo de realización, la manipulación controlada de las partículas en el sistema de micropocillos abiertos invertidos incluye la activación de uno o más de una serie de electrodos adecuadamente posicionados en un micropocillo, así como los electrodos colocados adecuadamente en los microcanales. Ejemplos de disposiciones de electrodos se muestran en las figuras 2 y 9-13.

Los métodos divulgados en el presente documento incluyen métodos para cribar células individuales o pequeños grupos de células, incluyendo agregados precisos de partículas específicas. El análisis de células individuales se proporciona, en general, para identificar células capaces de producir una respuesta específica, por ejemplo, a un biomaterial añadido que puede ser una célula diferente, una porción celular, una proteína, una molécula de ácido nucleico, un fármaco, un anticuerpo, una enzima y similares. La producción de agregados precisos permite la alineación precisa de células que, juntas, pueden inducir una respuesta deseada y/o sólo juntas se pueden analizar para una característica, capacidad o función específica. El sistema hace posible, por ejemplo, la alineación de múltiples partículas en un agregado, estando las células en contacto directo o en estrecha proximidad para un contacto funcional. Dicha alineación de células en un agregado preciso permite realizar pruebas rápidas y eficientes de interacciones partícula-partícula.

25 Breve descripción de las figuras

La figura 1 es un diagrama esquemático de un sistema de micropocillos abiertos invertidos, que muestra células depositadas en el menisco del micropocillo abierto con fluido que se mueve por el microcanal, con suministro de partículas desde el microcanal al micropocillo por gravedad.

La figura 2 es un diagrama en sección transversal que muestra una configuración de 3 electrodos en un sistema de micropocillos abiertos invertidos.

La figura 3 es un diagrama esquemático que muestra un sistema de micropocillos abiertos invertidos que comprende una pluralidad de micropocillos conectados a un sistema fluídico que proporciona fluidos a los microcanales y un sistema de formación de imágenes que soporta la inspección óptica del contenido de los micropocillos abiertos invertidos.

La figura 4 es un diagrama que muestra la recuperación del contenido de los micropocillos en una placa de microvaloración.

La figura 5 es un diagrama que muestra la recuperación del contenido de los micropocillos desde un sistema que comprende una pluralidad de micropocillos abiertos a un sustrato de recuperación.

La figura 6 muestra fotografías del menisco de un micropocillo abierto invertido observado bajo un microscopio de fluorescencia invertido mostrando (A) células K562 colocadas al azar en el menisco cuando no se aplicó un campo eléctrico para enfocar las células durante el descenso y (B) células K562 manipuladas por fuerzas electromagnéticas a un eje vertical central del micropocillo durante el descenso y depositadas como un agregado de células cerca del centro del menisco.

La figura 7 incluye una gráfica y una serie de fotografías que muestran una disminución en la intensidad de la señal fluorescente del biomarcador como una medida de la captación de calceína en una célula diana viva durante 20 minutos después de la exposición de las células individuales a linfocitos T activados para inducir la lisis de la célula individual.

La figura 8 muestra una serie de fotografías (A, B, C) que demuestran la expansión clonal de una célula K562 individual recuperada de un micropocillo abierto después del posicionamiento dielectroforético y transferidas a placas de microvaloración en forma de V para expansión durante 5 días: A = día 0; B = 3 días; C = 5 días. (D) es un gráfico que muestra un aumento en el número relativo de células durante un periodo de seis días.

La figura 9 es un dibujo esquemático que muestra una vista superior de una disposición representativa de electrodos en el microcanal y el micropocillo para el movimiento dielectroforético controlado de una partícula en el microcanal y en el micropocillo de un sistema de micropocillos abiertos invertidos.

La figura 10 es una vista en sección del dibujo esquemático de la figura 9 a través de la línea A-A', que muestra una disposición de electrodos en el micropocillo y el microcanal.

La figura 11 es una vista en sección del dibujo esquemático de la figura 9 a través de la línea B-B', que muestra una disposición de electrodos en el microcanal.

5 La figura 12 muestra un conjunto de electrodos centrado en la posición de un micropocillo mostrado a través de la parte superior de un sistema de micropocillos abiertos invertidos y que muestra la disposición de electrodos en el microcanal para atrapar una partícula en el canal a un potencial eléctrico mínimo (Δ). Esta disposición es la más adecuada cuando no hay un flujo de fluido por el canal.

10 La figura 13 muestra una disposición de electrodos centrada corriente arriba de un micropocillo, mostrada a través de la parte superior de un sistema de micropocillos abiertos invertidos y que muestra la disposición de electrodos en el microcanal para manipular una partícula (\bullet) hacia un potencial eléctrico mínimo (Δ) establecido por las fuerzas específicas aplicadas por los electrodos.

15 La figura 14 es una vista en sección de un modo de realización, que muestra una disposición alternativa de electrodos en el microcanal, que contiene un electrodo dispuesto a lo largo de la parte superior del microcanal.

La figura 15 muestra una disposición de electrodos, de acuerdo con algunos modos de realización, centrada corriente arriba de un micropocillo, mostrada a través de la parte superior de un sistema de micropocillos abiertos invertidos, y que muestra la disposición de electrodos en el microcanal para manipular una partícula (\bullet) a lo largo de F-F'.

20

La figura 16 muestra una disposición de electrodos, de acuerdo con algunos modos de realización, centrada corriente arriba de un micropocillo, mostrada a través de la parte superior de un sistema de micropocillos abiertos invertidos, y que muestra la disposición de electrodos en el microcanal para manipular una partícula (\bullet) a lo largo de F-F'.

25

Descripción detallada de los modos de realización preferidos

30 A. DEFINICIONES

Los siguientes términos y frases pretenden proporcionar las definiciones mostradas a continuación:

35 Micropocillo, como se usa en el presente documento, significa un pocillo formado con dimensiones micrométricas (menos de 1000 micrómetros), incluyendo altura, área de sección transversal, por ejemplo, diámetro en el que el micropocillo es tubular y volumen.

Microcanal, como se usa en el presente documento, significa un canal que proporciona fluido al micropocillo, que tiene un área de sección transversal de dimensiones micrométricas (inferior a 1000 micrómetros).

40

Partícula, como se usa en el presente documento, incluye cualquier partícula que pueda ser suministrada, manipulada, reaccionada o analizada en el micropocillo del sistema de micropocillos abiertos invertidos divulgado. La partícula puede ser una célula o porción celular, un microorganismo, una molécula biológica tal como una proteína, polinucleótido, anticuerpo, enzima o un sustrato tal como una partícula polimérica que se puede recubrir con una sustancia reactiva, por ejemplo, una esfera recubierta de antígeno, y similares.

45

Menisco, como se usa en el presente documento, significa la interfaz aire-fluido formada en el extremo inferior del micropocillo abierto invertido por tensión superficial.

50 Electrodo, como se usa en el presente documento, es un material conductor eléctrico, por ejemplo, metal, tal como oro, cobre; níquel-oro y similares. Los electrodos preferentes están formados por oro de alta pureza.

Material dieléctrico, como se usa en el presente documento, es un sustrato aislante eléctrico. Los materiales dieléctricos preferentes para uso en el sistema de micropocillos abiertos invertidos incluyen poliimida, tal como Kapton® y Pyralux®.

55

Dielectroforesis, como se usa en el presente documento, es una fuerza ejercida sobre una partícula cuando se somete a un campo eléctrico no uniforme.

60 "Un"/"Una" significa al menos uno/una.

"Pluralidad" significa dos o más.

"Micro" significa que tiene al menos una dimensión inferior a 1000 micrómetros.

65

"Comprende" o "que comprende" significa que incluye al menos los elementos o etapas citados, y está abierto a la

inclusión de elementos o etapas adicionales.

B. ABREVIATURAS

5 Las siguientes abreviaturas se usan como se muestra a continuación:

DEF significa dielectroforesis

CSA significa célula secretora de anticuerpos

10 LCT significa linfocito citotóxico

NK significa linfocito citolítico natural (natural killer)

15 LCL significa línea celular linfoblastoide

ADCC significa citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos

CMC significa citotoxicidad mediada por complemento

20 PCB significa placa de circuito impreso.

C. DISPOSITIVO Y SISTEMA DE MICROPOCILLOS ABIERTOS INVERTIDOS

25 El sistema de micropocillos abiertos invertidos incluye un dispositivo (100) que comprende una (figura 1) o una pluralidad (figura 3) de micropocillos, en el que cada micropocillo (102) está en comunicación de fluido con uno o con una pluralidad de microcanales (104) para el suministro de fluido y de partículas a los micropocillos. El microcanal está dispuesto, en general, por encima del micropocillo, estando el micropocillo abierto al microcanal de fluido en un extremo superior (106) y abierto en un extremo inferior (108) a la atmósfera en el exterior del dispositivo, por ejemplo, al aire u otro gas. El micropocillo tiene un eje vertical (110), por ejemplo, un eje central, que se extiende entre el extremo superior y el extremo inferior del micropocillo. El fluido insertado en el microcanal llena el micropocillo por acción capilar, mientras que la tensión superficial mantiene el fluido dentro del micropocillo abierto, formando un menisco (122) en la interfaz aire-fluido.

30
35 En esta aplicación, la atmósfera en el exterior del dispositivo en el extremo inferior abierto del micropocillo se ejemplifica como "aire". Se debe entender que la atmósfera se puede controlar, por ejemplo, en una cámara, para contener un gas distinto del aire, por ejemplo, enriquecido con dióxido de carbono, nitrógeno u otro gas como se desee para el mantenimiento de las partículas y/o el análisis que se vaya a realizar dentro del micropocillo. La cámara puede incluir un sistema para controlar la composición, humedad, temperatura, presión del gas y/u otros parámetros físicos y/o para mantener el entorno en una condición estéril.

40
45 En un modo de realización, se crea una cámara cerrada colocando el sustrato del dispositivo 114 sobre una placa de microvaloración cuyos pocillos están alineados con los micropocillos abiertos invertidos. La alineación conserva el espacio entre el micropocillo abierto y la superficie de la placa de microvaloración, de tal manera que se separan el contenido del micropocillo abierto y de la placa de microvaloración, por ejemplo, el contenido de fluido. Los pocillos de microvaloración pueden contener un medio líquido, por ejemplo, un medio fisiológico utilizado para la recuperación celular y el cultivo celular, por ejemplo, para aceptar el contenido del micropocillo abierto cuando se libera. Los pocillos de microvaloración pueden contener un medio diferente, tal como agua u otro fluido, por ejemplo, para aumentar la humedad de la cámara cerrada. Al aumentar la humedad de la atmósfera de la cámara cerrada debido a la evaporación del líquido en el pocillo de microvaloración, la presión de vapor en la cámara se puede saturar e impedir la evaporación del fluido del micropocillo abierto invertido en la cámara. En un modo de realización, la atmósfera de la cámara cerrada está completamente saturada, por ejemplo, a un o aproximadamente a un 100 % de humedad, para evitar la evaporación en el menisco. La temperatura del sustrato 114 se puede mantener más alta que la temperatura del aire húmedo contenido en la cámara con el fin de evitar la condensación sobre la superficie del sustrato.

50
55
60 El sistema de micropocillos abiertos invertidos se puede utilizar para conseguir un suministro controlado de una o más partículas, tales como una o más células vivas, al micropocillo, para provocar la interacción de una partícula suministrada en el micropocillo con una o más partículas adicionales suministradas al micropocillo, y/o para permitir un análisis de alto rendimiento de una función biológica, por ejemplo, induciendo reacciones específicas dentro del micropocillo, analizando los resultados de las reacciones, con identificación y recuperación opcional de partículas seleccionadas y/o productos biológicos de partículas seleccionadas.

65 El sistema puede servir como una "mini-centrífuga", con cambios en el fluido contenido en el canal que proporciona cambios en el lavado y en los reactivos dentro del micropocillo abierto sin desplazamiento ni pérdida de las partículas situadas en el menisco. En un modo de realización particular, el fluido contenido en el micropocillo es

adecuado para la manipulación dielectroforética de partículas. Después de colocar una partícula en el micropocillo, por ejemplo, en el menisco, el medio dielectroforético fluido se puede eliminar del micropocillo y reemplazar por un medio de ensayo adecuado o por un medio adecuado para el crecimiento y la expansión de la partícula colocada.

5 El sistema de micropocillos invertidos proporciona una monitorización eficiente y eficaz en tiempo real de las funciones de las partículas, incluyendo interacciones de múltiples partículas, cribado funcional y clasificación de partículas, por ejemplo, células vivas. En un modo de realización particular, el sistema proporciona un análisis funcional de alto rendimiento y una rápida identificación y selección de células secretoras de anticuerpos y de anticuerpos de alta afinidad, análisis de actividad lítica y selección de linfocitos citotóxicos deseados y linfocitos citolíticos naturales (natural killer), por ejemplo, mediante ensayo ADCC o CMC. El sistema permite el análisis rápido de la afinidad y especificidad de moléculas secretadas por células individuales, por ejemplo, anticuerpos monoclonales, así como la recuperación de las células secretoras de anticuerpos identificadas y/o de los anticuerpos secretados, y también permite la expansión de las células identificadas dentro del micropocillo.

15 Los atributos estructurales del dispositivo, incluyendo geometrías relativas, recubrimientos, presiones, materiales y calidades de los fluidos, partículas y reactivos previstos para ser colocados en el micropocillo, se optimizan para análisis particulares para proporcionar una funcionalidad óptima. Por ejemplo, se puede diseñar un recubrimiento aplicado a las paredes interiores del micropocillo en comparación con el aplicado a las paredes del microcanal adyacente al micropocillo para disponer de un carácter hidrófobo/hidrófilo opuesto para repeler los materiales no deseados fuera del pocillo y/o para acomodar la entrada de una partícula o partículas deseadas.

25 El diámetro y/o la longitud del micropocillo se diseñan para permitir la formación de un menisco en el extremo inferior del micropocillo en la interfaz del fluido con el entorno exterior, por ejemplo, aire, y para permitir que una partícula o partículas depositadas sobre el menisco queden retenidas con escala o ninguna fuga de fluido del micropocillo y para permitir el intercambio de fluidos y reactivos en el micropocillo mientras se conservan las partículas posicionadas en el menisco. La anchura, la altura y la longitud del microcanal se diseñan para crear una resistencia hidráulica que, bajo flujos específicos de fluido, produce una presión en el microcanal que está dentro de un intervalo que permite llenar los micropocillos evitando que el fluido escape por el lado inferior del micropocillo. Estas y otras características del sistema de micropocillos abiertos invertidos y su uso se describen y ejemplifican en el presente documento.

1. Micropocillo

35 Como se muestra, por ejemplo, en la figura 1, el dispositivo 100 de micropocillos abiertos invertidos incluye un micropocillo 102 que tiene dimensiones en la escala micrométrica. El micropocillo abierto puede tener una forma tubular, por ejemplo, con un eje de sección transversal circular. También se pueden usar micropocillos de otras formas, por ejemplo, cónicos, rectangulares u otra forma geométrica. En un modo de realización, el micropocillo se forma con una anchura expandida en el extremo superior que se extiende desde un extremo inferior estrechado.

40 La figura 1 muestra una vista en sección transversal de un dispositivo 100 que incluye un micropocillo abierto 102. El dispositivo 100 incluye un sustrato 114 que define una pared vertical 112 del micropocillo 102 que se extiende transversalmente entre un extremo superior abierto 106 y un extremo inferior abierto 108 del micropocillo abierto 102.

45 El sustrato 114 puede ser un plástico moldeable, por ejemplo, poli(metacrilato de metilo) (PMMA), policarbonato, naftalato de polietileno (PEN), tereftalato de polietileno (PET), polímero de cicloolefina y similares.

50 El sustrato 114 puede tener un grosor, por ejemplo, de aproximadamente 10 μm a aproximadamente 500 μm , inclusive, y puede ser, por ejemplo, de 12,5, 25 o 50 μm de grosor. En algunos modos de realización, particularmente en los modos de realización que comprenden electrodos, el sustrato 114 está formado, al menos en parte, por un material dieléctrico, por ejemplo, poliimida, Kapton®, Pyralux® y materiales similares.

2. Electrodos

55 Como se muestra en la figura 2, el sistema de micropocillos invertidos puede incluir uno o una pluralidad de electrodos acoplados a una fuente de alimentación para aplicar voltajes a los electrodos. En varios modos de realización, se pueden disponer electrodos en el micropocillo y en el microcanal para controlar las fuerzas eléctricas ejercidas sobre una partícula, por ejemplo, para empujar o tirar de una partícula en un microcanal hacia un micropocillo y/o para introducir o sacar una partícula de un micropocillo, o para facilitar el transporte de una partícula desde la entrada del micropocillo abierto hasta el extremo inferior del micropocillo, o cualquier porción de éstos.

65 Aunque en el micropocillo de la figura 2 se muestran tres electrodos 116, 118, 120, el dispositivo 100 puede de forma alternativa incluir más o menos electrodos. En un modo de realización, el micropocillo está rodeado por al menos un electrodo anular 116. En otro modo de realización, un par de electrodos enfrentados 116, 116A rodea el micropocillo. En un modo de realización, un par de electrodos enfrentados se pueden posicionar cerca del extremo superior 106 del micropocillo abierto, proporcionando una entrada controlada de una partícula 128 al micropocillo y/o

un posicionamiento controlado de una partícula a lo largo de un eje vertical 110, por ejemplo, un eje vertical central.

Los electrodos también se pueden disponer en el microcanal para afectar al transporte de partículas. Por ejemplo, las figuras 10-11 muestran posibles disposiciones de electrodos dentro del microcanal 155, 156, 153, 154 y dentro del micropocillo 116, 118. Las figuras 12-13 muestran un conjunto ejemplar de electrodos 153-164 dispuestos en pares a lo largo del microcanal para facilitar el transporte de una partícula hacia el micropocillo 102 y fuera del micropocillo 102.

Los electrodos están formados por un material conductor que puede estar, por ejemplo, en forma de hojas o placas conductoras. En algunos modos de realización, el material conductor comprende un metal biocompatible, tal como oro, carbono o aluminio. En el modo de realización mostrado, los electrodos 116, 118, 120 y 153-164 están incrustados en un sustrato 114 de manera que los electrodos adyacentes estén separados entre sí por porciones del sustrato 114, por ejemplo, en una configuración laminada que es perpendicular al eje vertical 110 del micropocillo (véase la figura 2).

3. Microcanal

Como se muestra, por ejemplo, en las figuras 1, 2 y 3, en un sistema de micropocillos abiertos invertidos 100, 101, el micropocillo 102 se comunica con un microcanal 104 para transportar un fluido 130 que puede contener una o más partículas 128. El microcanal 104 se puede asociar a uno o una pluralidad de micropocillos 102, por ejemplo, con una o más filas de micropocillos 102 en el dispositivo 100, 101.

El microcanal puede estar formado por un polímero, por ejemplo, poliimida, cerrado con una cubierta superior 124, preferentemente formada por un material transparente tal como vidrio o un plástico adecuado, tal como PMMA, policarbonato, PEN, PET, polímero de cicloolefina. El microcanal formado se puede entonces adherir a la parte superior del o de los micropocillos, por ejemplo, con un adhesivo biocompatible.

El extremo superior 106 del micropocillo está abierto al microcanal 104. Por ejemplo, se puede hacer que el fluido 130 fluya a través del microcanal 104 creando una diferencia de presión en ambos extremos del microcanal 104. El microcanal 104 se puede conectar a una bomba 132 tal como una bomba peristáltica, por ejemplo, o una fuente de aire a presión, y similares. El caudal de fluido 130 en el microcanal se puede controlar ajustando la diferencia de presión entre los extremos del microcanal 104, controlando de esa forma la velocidad a la que pasan la o las partículas 128 por el o los micropocillos 102.

4. Pluralidad o conjunto de micropocillos

Como se muestra en la figura 3, el dispositivo 101 puede incluir una pluralidad de micropocillos 102 dispuestos en un patrón ordenado. Por ejemplo, el dispositivo 101 puede incluir un conjunto o matriz de micropocillos, por ejemplo, en filas y columnas que pueden estar en comunicación con uno o una pluralidad de microcanales 104. El dispositivo 101 se puede utilizar para ejecutar múltiples operaciones en paralelo sobre una pluralidad de micropocillos 102 simultáneamente. Si bien la discusión que sigue se refiere a un micropocillo individual 102, los modos de realización descritos son aplicables a cada uno de una pluralidad de micropocillos 102, por ejemplo, que se pueden disponer como un conjunto o matriz de micropocillos 102 en un dispositivo 101 y que puede contener varias configuraciones de micropocillos 102 y microcanales 104. La configuración de los micropocillos se puede diseñar para una mayor conveniencia, por ejemplo, para acomodar un sistema tradicional de transferencia, tal como una placa de microvaloración de 96 pocillos o un conjunto de microviales de 1536 pocillos, y similares. El diseño también puede ser para propósitos específicos, tales como alto rendimiento.

5. Producción de un dispositivo de micropocillos invertidos

Para formar un dispositivo de micropocillos invertidos, en un ejemplo, los micropocillos 102 se pueden producir como orificios pasantes formados a través de un sustrato 114 con electrodos incrustados 116, 118, 120. Los orificios pasantes se pueden formar por métodos de perforación convencionales utilizando, por ejemplo, técnicas mecánicas o de láser. La producción ejemplar de un sistema de micropocillos invertidos se describe en los Ejemplos siguientes.

En algunos modos de realización, los micropocillos 102 tienen una sección transversal circular o redonda; sin embargo, los micropocillos 102 pueden tener secciones transversales de otras formas, por ejemplo, hexagonales, rectangulares, cuadradas, cónicas y similares. El diámetro del micropocillo 102 es, en general, inferior a 1000 micrómetros y puede variar, por ejemplo, de acuerdo con las dimensiones de las células u otras partículas se ve van a depositar en el micropocillo, así como de acuerdo con las relaciones geométricas necesarias para retener suficiente tensión superficial para formar y mantener el menisco 122. El diámetro del micropocillo puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 70 μm a aproximadamente 150 μm , o, por ejemplo, de aproximadamente 50 μm a aproximadamente 100 μm . La profundidad (altura) del micropocillo es preferentemente igual o mayor que el diámetro, y puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 50 μm a aproximadamente 300 μm , por ejemplo de aproximadamente 70 μm a 200 μm . La relación entre el diámetro y la profundidad (altura) puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 1 a 1; de 1 a 1,25; de 1 a 1,5; o de 1 a 2.

En un modo de realización se construyó un dispositivo en el que el microcanal tenía una longitud de 27 mm, una anchura de 350 μm y una altura de 150 μm . El micropocillo tenía un diámetro de 100 μm y una altura de aproximadamente 75 μm . No se aplicaron recubrimientos hidrófobos ni hidrófilos. Las superficies de polimida en el microcanal y en el lado inferior del dispositivo presentaban un comportamiento hidrófilo modesto, al igual que el lado superior del canal construido con policarbonato transparente, mientras que la parte interior del micropocillo perforado mecánicamente tenía una mayor rugosidad que, consecuentemente, mejoró el comportamiento hidrófilo de la parte interna del micropocillo. Esta diferencia en las propiedades superficiales, en la que la parte interna del micropocillo era más hidrófila que el microcanal y que la superficie inferior, combinada con el dimensionamiento adecuado del microcanal y del micropocillo, resultó sorprendentemente suficiente para permitir que el micropocillo se llenara adecuadamente con fluido del microcanal, sin generar ninguna fuga desde el fondo del micropocillo abierto.

6. Superficies hidrófilas/hidrófobas

Para facilitar la introducción y retención de una o más partículas 128 en cada micropocillo 102, el dispositivo 100, 101 se puede configurar de modo que ciertas superficies sean hidrófobas mientras que otras superficies sean hidrófilas. En algunos modos de realización, las superficies se hacen hidrófobas o hidrófilas aplicando un recubrimiento sobre las superficies. Por ejemplo, en modos de realización que utilizan un fluido acuoso, la superficie inferior del microcanal 143 y la pared vertical del micropocillo 112 pueden ser hidrófilas y la superficie inferior 142 puede ser hidrófoba. Como otro ejemplo, en modos de realización que utilizan un fluido lipídico, la superficie inferior del microcanal 143 y la pared vertical del micropocillo 112 pueden ser hidrófobas y la superficie inferior 142 puede ser hidrófila. Kapton y poliimida presentan un comportamiento hidrófilo discreto, con un ángulo de contacto en el intervalo entre 20 y 70 grados. Aplicando un tratamiento de superficie de plasma, por ejemplo, un plasma de oxígeno, las superficies de Kapton y poliimida se vuelven más hidrófilas. Los recubrimientos hidrófobos que se pueden aplicar a superficies de poliimida o Kapton incluyen FEP, Certonal® FC-732 o Chemlease® 41-90.

El fluido 130, por ejemplo, un tampón fisiológico o un medio de cultivo, se introduce en un microcanal 104 posicionado por encima y en comunicación de fluido con el extremo superior abierto 106 de uno o más micropocillos 102. El micro-tamaño del pocillo y el comportamiento hidrófobo del extremo inferior abierto 108 del micropocillo 102, en contraste con una naturaleza hidrófila del microcanal 104 y el extremo superior del micropocillo 102, permiten que el fluido llene el micropocillo que tiene un fondo abierto, sin fugas desde el extremo inferior abierto 108. Cuando se utiliza un micropocillo con un fondo cerrado, para facilitar el llenado del micropocillo se puede insertar inicialmente un agente humectante, por ejemplo, etanol o etanol mezclado con agua, en el microcanal antes de insertar un medio fisiológico. La acción capilar y la tensión superficial retienen el fluido 130 en el micropocillo y forman un menisco 122 en la interfaz fluido-aire, como se muestra en la figura 1. En un modo de realización, el fluido puede contener un agente humectante para facilitar al llenado del microcanal y/o del micropocillo. Ejemplos de agentes humectantes incluyen, por ejemplo, etanol, Tween-20 y SDS. Antes de insertar la suspensión celular, los microcanales se aclaran adecuadamente con medio fisiológico, por ejemplo, tampón fosfato salino (PBS), para eliminar los residuos de los agentes humectantes.

7. Suministro controlado y focalización de partículas

7.1 Suministro controlado

Un fluido que contiene partículas, por ejemplo, células, puede ser suministrado al microcanal 104 a una concentración y un caudal diseñados para permitir la distribución de un número limitado de partículas, por ejemplo, una sola partícula, en cada micropocillo 102. Los electrodos se pueden utilizar para transportar partículas en el microcanal 104 para permitir o denegar el acceso de partículas 128 al micropocillo 102 desde el microcanal 104 para manipular una partícula o partículas 128 dentro del micropocillo, para focalizar y mantener una partícula en una posición deseada dentro del micropocillo, para inducir cambios estructurales o funcionales en una partícula o partículas dispuestas dentro del micropocillo, y/o para detectar y/o medir la presencia, el movimiento o el cambio en una partícula dentro del micropocillo, o para detectar y/o medir la presencia de moléculas producidas por una partícula dentro del micropocillo.

Un modo de realización, por ejemplo, descrito en las figuras 9-11, aprovecha el flujo de fluido por el canal para transportar las partículas de interés desde una entrada a un micropocillo particular, con la posibilidad adicional de configurar fuerzas dielectroforéticas para que la partícula pueda saltar un micropocillo y llegar a otro situado a lo largo del microcanal. Un modo de realización, descrito en las figuras 12 y 13, muestra un conjunto matriz de electrodos que no requieren un flujo de fluido para transportar una partícula desde el microcanal hacia un micropocillo, pero que aplica fuerzas dielectroforéticas para hacerlo.

7.2 Transporte de partículas a microcanales en ausencia de un flujo de fluido

Se necesita un transporte preciso en los microcanales para un suministro preciso a micropocillos específicos cuando se desea que cada partícula llegue a una posición precisa. Una forma de controlar el suministro preciso se basa en una secuencia de cambios de parámetros eléctricos que proporciona resultados muy precisos sin depender del flujo

de fluido o de técnicas similares.

Una partícula que tiene una constante dieléctrica compleja, cuando se expone a campos eléctricos que varían espacialmente, es empujada por dielectroforesis negativa de acuerdo con el valor del factor de Clausius-Mossotti. En este caso, la partícula se moverá hacia el mínimo del campo eléctrico y será repelida por el máximo del campo eléctrico.

Como se muestra en las figuras 10, 11, 12 y 13, por ejemplo, los electrodos 155 y 156 se colocan por encima de los electrodos 153, 154, 157, 158, 159, 160, 161 y 162. En particular, el electrodo 155 se coloca por encima de los electrodos 153, 157, 159 y 161, mientras que el electrodo 156 se coloca por encima de los electrodos 154, 158, 160 y 162. Estos electrodos se pueden usar para crear un patrón de intensidad de campo eléctrico que provoque que la partícula (●) 128 se mueva en una dirección deseada en el microcanal 104.

En un ejemplo, cada uno de los electrodos 153, 157, 161 y 156 está conectado a una fuente de voltaje sinusoidal a un potencial eléctrico especificado. Los patrones de electrodos enfrentados 154, 158, 162 y 155 están cada uno conectado a una fuente de voltaje sinusoidal de la misma amplitud que su compañero enfrentado, pero con una diferencia de fase de 180 grados. Los electrodos 159 y 160 están conectados a tierra (G1).

En este escenario, el campo eléctrico en el microcanal 104 alcanza un mínimo (Δ) 170 en la separación entre electrodos 159 y 160, ya que están al mismo potencial eléctrico y su grosor crea un rebaje que induce un mínimo fuerte del campo eléctrico: El campo eléctrico en el microcanal 104 alcanza un máximo en el que los pares de electrodos 153-154, 157-158, 161-162 enfrentados entre sí están polarizados con voltajes con una diferencia de fase de 180 grados. En este caso, una partícula (●) 128 está atrapada en la posición en la que el mínimo (Δ) 170 entre los electrodos 159, 160 está rodeado por posiciones en las que el campo eléctrico alcanza un máximo de intensidad.

La posición de la partícula atrapada se puede cambiar y desplazar, por ejemplo, como se muestra en la figura 13, hacia la izquierda en dos fases. Durante una primera fase, el voltaje de los electrodos 157, 158 situados a la izquierda de la posición de reposo existente, se pone a tierra (G2). Esto crea un campo eléctrico mínimo (Δ) que tiene la misma intensidad que el existente entre los electrodos 159 y 160. Durante una segunda fase, el electrodo 159 se polariza como el electrodo 161 y el electrodo 160 como el electrodo 162. Esta polarización crea un fuerte campo eléctrico entre los electrodos 159 y 160. Este campo empuja hacia fuera una partícula atrapada allí que caerá en el mínimo más cercano (Δ) del campo eléctrico, desplazando la partícula una posición a su izquierda.

Por lo tanto, el desplazamiento de las partículas obtenido de esta manera no requiere un flujo de fluido.

En otro ejemplo, los electrodos 155 y 156 son sustituidos por un electrodo único 190 situado a lo largo del lado superior del microcanal, como se muestra en la figura 14. El electrodo 190 se puede implementar, ya sea cerrando el microcanal en la parte superior con un material metálico o con un material transparente, tal como vidrio o un plástico transparente, recubierto con óxido de indio y estaño (ITO). Este recubrimiento conductor proporciona una conexión eléctrica mientras mantiene una cubierta superior transparente que no impide la inspección óptica o la iluminación desde el lado superior.

En este ejemplo, el electrodo 190 está conectado a tierra, mientras que cada uno de los electrodos 153, 157 y 161 está conectado a una fuente de voltaje sinusoidal a un potencial eléctrico especificado. Los patrones de electrodos enfrentados 154, 158 y 162 están cada uno conectado a una fuente de voltaje sinusoidal de la misma amplitud que su compañero enfrentado, pero con una diferencia de fase de 180 grados. Los electrodos 159 y 160 están conectados a una fuente de voltaje sinusoidal de la misma amplitud que los electrodos 163, 157 y 161, pero con una diferencia de fase de 90 o 270 grados.

En este escenario, el campo eléctrico en el microcanal 104 alcanza un mínimo (Δ) 170 en la separación entre electrodos 159 y 160, ya que están al mismo potencial eléctrico y su grosor crea un rebaje que induce un mínimo fuerte del campo eléctrico: El campo eléctrico en el microcanal 104 alcanza un máximo en el que los pares de electrodos 153-154, 157-158, 161-162 enfrentados entre sí están polarizados con voltajes con una diferencia de fase de 180 grados. En este caso, una partícula (●) 128 está atrapada en la posición en la que el mínimo (Δ) 170 entre los electrodos 159, 160 está rodeado por posiciones en las que el campo eléctrico alcanza un máximo de intensidad.

Con esta configuración de electrodos, la posición de la partícula atrapada se puede cambiar y desplazar, por ejemplo, hacia la izquierda en dos fases. Durante una primera fase, el voltaje de los electrodos 157, 158 situados a la izquierda de la posición de reposo existente, se fija a una fuente de voltaje sinusoidal de la misma amplitud que la de los electrodos 153, 157 y 161, pero con una diferencia de fase de 90 o 270 grados. Esto crea un campo eléctrico mínimo (Δ) que tiene la misma intensidad que el existente entre los electrodos 159 y 160. Durante una segunda fase, el electrodo 159 se polariza como el electrodo 161 y el electrodo 160 como el electrodo 162. Esta polarización crea un fuerte campo eléctrico entre los electrodos 159 y 160. Este campo empuja hacia fuera una partícula atrapada allí que caerá en el mínimo más cercano (Δ) del campo eléctrico, desplazando la partícula una posición a su izquierda.

La figura 12 muestra una estructura que se puede utilizar para el suministro con precisión de partículas a un micropocillo 102 en ausencia de flujo de fluido. El par de electrodos 155, 156 no se muestra en la figura 12 pero, como se muestra en las figuras 9 y 10, el par está situado por encima de los otros electrodos, con el electrodo 155 en una posición por encima de los electrodos 163, 116, 153, mientras que el electrodo 156 está en una posición por encima de los electrodos 164, 116A, 154.

Si los electrodos 116 y 116A se polarizan al voltaje de 156 y 155, respectivamente, mientras que los electrodos 153 y 154 están al mismo voltaje de tierra, es posible atrapar una partícula por dielectroforesis negativa en la posición (Δ) entre 153 y 154. La conexión entonces de los electrodos 116 y 116A a tierra, mientras que 153 y 154 se polarizan como 156 y 155, hace que una partícula sea empujada hacia el mínimo (Δ) 170 de campo eléctrico entre 116 y 116A, en la que se encuentra el micropocillo.

Dado que el electrodo 116, 116A rodea el micropocillo 102 y está conectado a tierra, se induce un campo eléctrico en el canal por debajo del micropocillo 102 debido a la presencia de los electrodos 155 y 156. Después del análisis anterior, la partícula es empujada ahora hacia el micropocillo.

En el caso de que la posición en la que la partícula desciende en el micropocillo deba ser controlada de manera precisa, el electrodo 118 se puede polarizar conectándolo a una fuente de voltaje que tenga una amplitud sustancialmente menor que la utilizada para controlar los electrodos 155 y 156 y con una fase girada 90 o 270 grados con respecto a los electrodos 155 y 156. Esta polarización crea una fuerza dielectroforética en el micropocillo que empuja la partícula hacia el centro del micropocillo.

Si se debe evitar el suministro de la partícula al micropocillo, se recomienda una polarización diferente de los electrodos en ausencia de flujo de fluido. En particular, suponiendo que una partícula está atrapada entre los electrodos 153, 154 que están conectados a tierra, el suministro de la misma se puede evitar conectando los electrodos 116, 163, 164 a tierra mientras el electrodo 116A se polariza como el electrodo 155 y el electrodo 153 se polariza como el electrodo 156 y el electrodo 154 se polariza como el 155. Estas polarizaciones crean un desplazamiento temporal de la partícula desde la posición situada entre 153 y 154 hasta una posición situada hacia el electrodo 116 (y no a la posición situada entre 116 y 116A) y finalmente hasta una posición de suministro estable entre los electrodos 163 y 164 en la que se encuentra un mínimo del campo eléctrico.

En otro ejemplo, la estructura mostrada en la figura 12 se puede utilizar para el suministro con precisión de partículas a un micropocillo 102 en ausencia de flujo de fluido. El par de electrodos 155, 156 se sustituye por un electrodo 190 posicionado en la parte superior del microcanal, como se muestra en la figura 16, y se conecta a tierra.

Si los electrodos 116 y 116A se conectan a una fuente de voltaje sinusoidal de la misma amplitud y una fase de 0 grados y 180 grados, respectivamente, mientras que los electrodos 153 y 154 se conectan al mismo voltaje sinusoidal con un desplazamiento de fase de 90 o 270 grados, es posible atrapar una partícula por dielectroforesis negativa en la posición (Δ) entre 153 y 154. La conexión entonces de los electrodos 116 y 116A a un voltaje sinusoidal con un desplazamiento de fase de 90 o 270 grados mientras que 153 y 154 se conectan a un voltaje sinusoidal de la misma amplitud y una fase de 0 grados y 180 grados, respectivamente, hace que una partícula sea empujada hacia el mínimo (Δ) 170 de campo eléctrico entre 116 y 116A, en la que se encuentra el micropocillo.

Dado que los electrodos 116, 116A rodean el micropocillo 102 y está conectados al mismo voltaje, se induce un campo eléctrico en el canal por debajo del micropocillo 102 debido a la presencia del electrodo 190. Después del análisis anterior, la partícula es empujada ahora hacia el micropocillo.

En el caso de que la posición en la que la partícula desciende en el micropocillo deba ser controlada de manera precisa, el electrodo 118 se puede polarizar conectándolo a una fuente de voltaje que tenga una amplitud sustancialmente menor que la utilizada para controlar los electrodos 116 y 116A y con una fase girada 90 o 270 grados con respecto a los electrodos 116 y 116A. Esta polarización crea una fuerza dielectroforética en el micropocillo que empuja la partícula hacia el centro del micropocillo.

Si se debe evitar el suministro de la partícula al micropocillo, se recomienda una polarización diferente de los electrodos en ausencia de flujo de fluido. En particular, suponiendo que una partícula está atrapada entre los electrodos 153, 154 que están conectados al mismo voltaje sinusoidal con un desplazamiento de fase de 90 o 270 grados, el suministro de la misma se puede evitar conectando los electrodos 116, 163, 164 a tierra mientras los electrodos 153, 116A y 154 se conectan al mismo voltaje sinusoidal con una fase de 0, 90 y 180 grados, respectivamente. El electrodo 190 permanece siempre conectado a tierra. Estas polarizaciones crean un desplazamiento temporal de la partícula desde la posición situada entre 153 y 154 hasta una posición situada hacia el electrodo 116 (y no a la posición situada entre 116 y 116A). Finalmente, al conectar el electrodo 116 al mismo voltaje sinusoidal del electrodo 153 con un desplazamiento de fase de 270 grados, la partícula alcanza una posición de suministro estable entre los electrodos 163 y 164 en la que se encuentra un mínimo del campo eléctrico.

Estas estructuras con los voltajes propuestos no se basan en la presencia de un flujo de fluido para el

desplazamiento y el suministro de partículas. Sin embargo, el flujo de fluido es apropiado para proporcionar un enfriamiento adecuado de la estructura. Estas estructuras se pueden usar para desplazar células individuales a lo largo de un microcanal y para conducir las a un micropocillo abierto o impedir que entren en un micropocillo abierto aplicando apropiadamente una secuencia de señales de polarización.

5 7.3 Transporte de partículas en microcanales y micropocillos abiertos en presencia de un flujo de fluido

10 Las figuras 9-11 representan la estructura de un micropocillo 102 en comunicación de fluido con un microcanal 104 cerrado en la parte superior por una superficie 124 que cubre el líquido contenido en el microcanal. Partículas tales como células o perlas que fluyen en dicho fluido del canal son sometidas a fuerzas electromagnéticas que causan que una partícula 128 sea empujada hacia un micropocillo 102 o empujada hacia fuera. Esta estructura es específicamente adecuada para operar cuando hay un flujo apreciable de fluido en el canal que pueda transportar las partículas. Véase, por ejemplo, Faenza *et al.*, 2011 (mayo), "Controlled isolation and patterning of k562 leukemia cells using electrically activated microchannels" en: Conferencia Internacional de Microtecnologías en Medicina y Biología.

20 Los electrodos están integrados en la estructura del micropocillo y del microcanal para controlar el movimiento de las partículas. Por ejemplo, la figura 9 muestra un micropocillo 102 rodeado por un electrodo 116 de forma que presenta una abertura hacia la dirección del flujo en una dirección que va de derecha a izquierda en la figura 9.

25 Los modos de realización específicos útiles para controlar el movimiento de partículas que se muestran en estas figuras incluyen dichos electrodos 116, 118 posicionados en el micropocillo 102, y dichos electrodos 153, 154 posicionados en el microcanal 104. La figura 10 muestra un micropocillo 102 en comunicación con un microcanal 104, teniendo cada uno una pared vertical 112 formada por una estructura laminada que contiene un sustrato dieléctrico 114 y electrodos. Los electrodos del microcanal 153-164 se disponen en el microcanal 104 mientras que los pares de electrodos 153-154 y 155-156 situados cerca de la unión del microcanal con el micropocillo 102 en su extremo superior abierto 108. Los electrodos del micropocillo 116 y 118 se disponen cerca del extremo superior y del extremo inferior del micropocillo, respectivamente.

30 Una partícula (●) 128 que se mueve por el microcanal 104 con el flujo de fluido se somete a una fuerza dielectroforética si su constante dieléctrica compleja es diferente de la del fluido circundante 130. Las partículas de interés, tales como células, micropérlas o liposomas, se caracterizan por estar impulsadas por dielectroforesis negativa que atrae estas partículas hacia los mínimos (Δ) 170 del campo eléctrico. Las partículas también tienen una densidad relativa mayor que la del tampón circundante. Por esta razón, caen por efecto de la gravedad.

35 Las figuras 10 y 11 muestran que una partícula colocada en el flujo del microcanal 104 encuentra los electrodos 153, 154, 155, 156 antes de alcanzar el micropocillo y el electrodo 116. Varias configuraciones de voltajes aplicados pueden provocar que una partícula 128 quede atrapada o sea expulsada por un campo eléctrico, según el principio de la dielectroforesis, en la que una partícula se desplaza en una dirección hacia un mínimo (Δ) 170 de un campo eléctrico y hacia fuera de un área con un fuerte campo eléctrico.

45 En un ejemplo, el electrodo 116 se pone a tierra. Los electrodos 155 y 156 son polarizados por una fuente de alimentación externa a un generador de voltaje. El voltaje del electrodo 155 tiene una fase que está girada 180 grados con respecto a la del electrodo 156. Los voltajes aplicados a los electrodos 155 y 156 tienen la misma amplitud. Los voltajes podrían cambiar como señales sinusoidales o como ondas cuadradas. Por esta razón, existe un campo eléctrico relativamente grande entre los dos electrodos 155 y 156.

50 La polarización de los electrodos 153 y 154 variará al llevar a cabo la tarea de atrapar o expulsar una partícula. Más específicamente, los electrodos 153 y 154 se pueden conectar a tierra en una configuración que se denomina "de atrapamiento". De forma alternativa, los electrodos 153 y 154 se pueden polarizar con voltajes sinusoidales u ondas cuadradas. Cuando están polarizados, la fase del electrodo 153 será la misma que la del electrodo 156, mientras que el electrodo 154 tendrá la fase del electrodo 155. Esta segunda configuración se denomina "de expulsión". Consulte la figura 11 para ver la posición relativa de los electrodos.

55 Siguiendo la configuración de electrodos mostrada en las figuras 9-11, cuando una partícula deseada 128 que fluye por el microcanal 104 va a ser atrapada en un micropocillo 102, los electrodos 153 y 154 se ajustan al potencial de tierra. Los electrodos 155 y 156 son polarizados por una fuente de alimentación externa a un generador de voltaje. El voltaje del electrodo 155 tiene una fase que está girada 180 grados con respecto a la del electrodo 156. Los voltajes aplicados a los electrodos 155 y 156 tienen la misma amplitud. Los voltajes podrían cambiar como señales sinusoidales o como ondas cuadradas. Por esta razón, existe un campo eléctrico relativamente grande entre los dos electrodos 155 y 156.

65 En esta condición, existe una situación "de atrapamiento", ya que el campo eléctrico alcanza un mínimo fuerte en la posición 170 colocada entre los electrodos 153 y 154. La región restante del canal está sometida a un campo eléctrico más fuerte que empuja la partícula hacia los mínimos (Δ). El grosor de los electrodos 153 y 154, así como del resto de electrodos, es de aproximadamente 5 a 30 micras. Esto crea una región (Δ) 170 en la que el campo

alcanza un mínimo, y en la que las partículas tienen aproximadamente el mismo tamaño que los electrodos circundantes.

5 La región (Δ) 170 está alineada con la abertura del micropocillo 102. Una partícula atrapada en la región de mínimos (Δ) 170 es empujada por el fluido que fluye por el microcanal hacia la abertura del micropocillo a lo largo de una trayectoria horizontal. La distancia entre esta región (Δ) 170 y la apertura del micropocillo 102 se mantiene en un valor tan pequeño como sea factible habida cuenta de la tecnología de fabricación. Si se utiliza una tecnología estándar de placa de circuito impreso, una distancia típica es de aproximadamente 20 a 100 micras. Dado que el electrodo 116 rodea el micropocillo 102 y está conectado a tierra, se induce un campo eléctrico en el canal por debajo del micropocillo 102 debido a la presencia de los electrodos 155 y 156. Después del análisis anterior, la partícula es empujada ahora hacia el micropocillo.

15 En el caso de que la posición en la que la partícula desciende en el micropocillo deba ser controlada de manera precisa, el electrodo 118 se puede polarizar conectándolo a una fuente de voltaje que tenga una amplitud sustancialmente menor que la utilizada para controlar los electrodos 155 y 156 y con una fase girada 90 o 270 grados con respecto a los electrodos 155 y 156. Esta polarización crea una fuerza dielectroforética en el micropocillo que empuja la partícula hacia el centro del micropocillo.

20 Si una partícula fluye por el microcanal 104 y no está previsto que llegue al micropocillo 102, se puede conseguir el efecto deseado polarizando los electrodos 153 y 154 en la configuración "de expulsión". En este caso, el mínimo del campo eléctrico se sitúa en el centro del microcanal 104. En esta posición, la partícula está expuesta al flujo de fluido y no queda atrapada por el micropocillo 102 si la distancia entre el micropocillo 102 y los electrodos 153 y 154 es pequeña.

25 En otro ejemplo, el movimiento controlado de la partícula se puede obtener atrapando inicialmente una partícula entre los electrodos 153 y 154 y después programando la configuración de "carga" o "expulsión" ajustando apropiadamente la polarización de los electrodos 153, 154 y 116 mientras se mantiene el electrodo 155 conectado constantemente a un voltaje sinusoidal y el electrodo 156 conectado al mismo voltaje sinusoidal que el electrodo 155 desplazado en 180 grados. Con el fin de atrapar inicialmente la partícula, los electrodos 153 y 154 están fijados a tierra, y el electrodo 116 está conectado al mismo voltaje sinusoidal que el electrodo 155 desplazado en 90 grados. Mediante el ajuste de un flujo de fluido dirigido desde los electrodos 153 y 154 hacia el micropocillo, es posible encontrar un valor del flujo que sea lo suficientemente bajo como para atrapar una partícula en el mínimo del campo eléctrico situado entre los electrodos 153 y 154 con una fuerza de arrastre que no sea suficiente para hacer avanzar la partícula y contrarrestar el campo eléctrico creado entre el electrodo 116 por un lado y los electrodos 155 y 156 por otro lado. Si es necesario suministrar la partícula en el micropocillo, entonces el electrodo 116 se conecta a tierra y la fuerza de arrastre desplazará la partícula hacia el micropocillo y luego al interior del micropocillo. Si, en cambio, la partícula tiene que desplazarse hacia delante, evitando el micropocillo, los electrodos 153 y 116 se conectan a la misma señal sinusoidal que el electrodo 156, mientras que el electrodo 154 se conecta al mismo voltaje sinusoidal que el electrodo 155. En esta configuración, la partícula se desplaza primero hacia arriba y luego hacia la porción de electrodo 116 situada debajo del electrodo 156, en la que se encuentra un mínimo del campo eléctrico. De esta manera se evita el micropocillo y no se suministra la partícula. Suponiendo ahora que hay un segundo micropocillo situado a lo largo del canal, con la misma arquitectura ilustrada en la figura 9, se puede fijar a tierra un nuevo conjunto de electrodos 153 y 154 y el electrodo 116 del primer micropocillo puede volver al voltaje inicial. De esta manera, el mínimo se encuentra ahora entre el par 153, 154 del segundo micropocillo y la partícula se colocará entre estos electrodos. Este esquema se puede repetir para varios pocillos situados a lo largo del mismo microcanal.

7.4 Detección de partículas en un microcanal

50 Cuando una partícula (●) en un microcanal 104 es manipulada por los electrodos mostrados en las figuras 9-14 en dichas configuraciones permitiendo que la partícula sea suministrada a un micropocillo objetivo, los electrodos producen el efecto de alinear la partícula a lo largo del eje F-F' como se muestra en las figuras 15-16. Además, la partícula es empujada verticalmente sobre el lado inferior del microcanal. El posicionamiento preciso de las partículas a lo largo de un eje predefinido y en una posición vertical precisa las hace adecuadas para ser detectadas ópticamente o por medición de impedancia, asumiendo un flujo de fluido laminar continuo presente en los microcanales y con el efecto de arrastre de la partícula a lo largo de la dirección F-F'. El beneficio de implementar la focalización celular a través de dielectroforesis para mejorar la detección óptica y el suministro de células en los micropocillos se demuestra, por ejemplo, en Duqi *et al.*, 2011 (mayo), "Automated isolation of a programmable number of cells into microwells using DEP forces and optical detection", Conferencia Internacional de Microtecnologías en Medicina y Biología.

60 En un modo de realización, una estructura compuesta por cuatro electrodos 170, 171, 172, 173 se posiciona apropiadamente corriente abajo de los electrodos de manipulación 153, 154 como se muestra en la figura 15. Los electrodos se diseñan para permitir que la partícula que se desplaza a lo largo de la dirección F-F' pase a través del hueco que queda entre los electrodos 170-171 y 172-173. Los electrodos 171, 173 están conectados a una señal de excitación 188 representada por un voltaje alterno, mientras que los electrodos 170, 172 están conectados a un circuito de lectura 186 que amplifica las corrientes de salida 180 y 182 y proporciona una señal de salida final 184

proporcional a la diferencia o la relación entre las señales 180, 182. Esto se logra utilizando esquemas de circuitos conocidos. La presencia de electrodos corriente arriba 153, 154, 155, 156 tiene el efecto de alinear las células a lo largo del eje en el que la relación señal-ruido producida en la señal de salida 184 por el paso de células individuales es máxima.

5 En otro modo de realización, la detección de una célula individual después de un correcto posicionamiento y alineación realizados por los electrodos 153, 154, 155, 156 se realiza por medio de una estructura compuesta por tres electrodos 174, 175, 176, como se muestra en la figura 16. El electrodo 175 está conectado a una señal de excitación 188 representada por un voltaje alterno, mientras que los electrodos 174, 176 están conectados a un
10 circuito de lectura 186 que amplifica las corrientes de salida 180 y 182 y proporciona una señal de salida final 184 proporcional a la diferencia o la relación entre las señales 180, 182. La presencia de electrodos corriente arriba 163, 164, 155, 156 tiene el efecto de alinear células a lo largo del eje en el que la relación señal-ruido producida en la señal de salida 184 por el paso de células individuales es máxima.

15 En un modo de realización, la detección de células individuales después de un correcto posicionamiento y alineación realizados por los electrodos 153, 154, 155, 156 se realiza por detección óptica, ya sea bajo condiciones de fluorescencia o de iluminación normal, colocando un sistema óptico de excitación y detección en el lado superior o inferior del conjunto de micropocillos y alineando el sistema óptico a lo largo del eje F-F'.

20 Una vez que la partícula se detecta de acuerdo con uno de los métodos previamente descritos, en un modo de realización específico la estructura representada por los electrodos 116, 153, 154, 155, 156, 116, 118 y el micropocillo 102 y mostrada en las figuras 9-11 se duplica y se sitúa corriente abajo de la región de detección o de los electrodos. El control de estos electrodos depende de la señal de detección 184 obtenida por medición óptica o eléctrica, de tal manera que una célula individual, cuando se detecte, pueda ser colocada selectivamente en un
25 micropocillo objetivo o apartada de él. Este modo de realización permite el posicionamiento preciso de células individuales o de un número predeterminado de células en micropocillos.

7.5 Focalización de partículas en un micropocillo

30 Cuando una partícula 128 entra en un micropocillo 102, la gravedad hace que la partícula 128 descienda por el micropocillo 102 hacia el menisco 122. Para garantizar que la partícula 128 permanece sustancialmente centrada en el micropocillo 102, los electrodos del micropocillo 116, 118, 120 pueden ser activados para forzar a la partícula 128 a colocarse en una posición central a través del diámetro del micropocillo 102. Por ejemplo, los voltajes aplicados a los electrodos 116, 118, 120 se pueden controlar para generar un campo eléctrico sustancialmente cero o
35 sustancialmente vertical en o cerca del eje vertical de simetría del micropocillo 102. Esto da lugar a que la partícula 128 se vea forzada a colocarse en el centro del micropocillo 102, provocando el descenso de la partícula 128 toda la longitud del micropocillo a lo largo de un eje central, depositándose en o cerca del centro del menisco 122. El descenso de la partícula puede ser facilitado por la gravedad o por fuerzas electromagnéticas, o una combinación de éstas.

40 Mientras que los electrodos del micropocillo 116, 118, 120 se muestran como electrodos anulares, en algunos modos de realización el micropocillo puede incluir pares de electrodos, por ejemplo, electrodos enfrentados, para efectuar la manipulación de partículas y el movimiento dentro del micropocillo. Además, el micropocillo puede contener electrodos adicionales, incluyendo por ejemplo, electrodos útiles en un análisis o reacción particular, tales
45 como la detección y/o medición de electrodos para detectar partículas, productos de células y cambios celulares. Los electrodos de detección o medición se pueden usar, por ejemplo, para medir cambios en la impedancia, la señal óptica, la polaridad y las señales eléctricas similares.

50 Una partícula 128 depositada sobre el menisco 122 permanece en una posición estable en el menisco 122 incluso después de que se apliquen fuerzas electromagnéticas, por ejemplo voltajes, sobre los electrodos. Los métodos ejemplares para aplicar voltajes a los electrodos para manipular partículas con dielectroforesis se describen en la Solicitud de patente US n.º 2009/0288963.

55 Cuando una partícula 128 ha entrado en un micropocillo 102, los electrodos 153y 154 situados en el lado inferior del microcanal cerca de la unión entre el micropocillo 102 y el microcanal 104 pueden ser activados para evitar que partículas adicionales que fluyen por el microcanal entren en el micropocillo. Por ejemplo, la fase del voltaje aplicado a los electrodos 153 y 154 se puede controlar para repeler otras partículas presentes en el fluido, esencialmente cerrando el micropocillo 102. Esto puede ocurrir después de que la partícula haya caído más allá del electrodo 116, por ejemplo, mientras que los electrodos 118 y 120 se pueden emplear para centrar la partícula en el micropocillo,
60 permitiendo que la partícula descienda por gravedad la longitud del micropocillo y permanezca sustancialmente en una posición central, incluso en ausencia de fuerza electromagnética aplicada.

65 En algunos modos de realización, a dos o más partículas 128 se les permite entrar en el micropocillo 102 y se posicionan de manera que se fuerza a las partículas a estar en contacto o en estrecha proximidad entre sí. Por ejemplo, después de que una primera partícula 128 se haya colocado sobre el menisco 122, el voltaje aplicado a los electrodos 153 y 154 se puede retirar, abriendo el micropocillo 102 para recibir una o más partículas adicionales del

microcanal 104. Cuando una o más partículas adicionales entran en el micropocillo 102 desde el microcanal 104, la partícula o partículas adicionales 128 se pueden centrar en el micropocillo 102 aplicando voltajes a los electrodos 118, 120 como se discutió anteriormente. La partícula o partículas adicionales 128 descienden a lo largo de un eje vertical de simetría 110 del micropocillo hasta que se posicionan en contacto o en estrecha proximidad de la partícula 128 en el menisco 122. En modos de realización alternativos, todas las partículas se introducen en el micropocillo en sustancialmente el mismo tiempo, y los electrodos 116, 118, 120 se activan para focalizar las partículas en el centro del micropocillo como un grupo agregado de células, formando un clúster de células depositadas en el menisco.

8. Observación microscópica de células depositadas

Debido a la naturaleza abierta de los micropocillos 102, es posible observar el acoplamiento de una partícula 128 en el menisco 122 en la interfaz fluido-aire en el extremo inferior 108 del micropocillo 102, por ejemplo, utilizando un microscopio, una cámara u otro dispositivo óptico. La partícula o partículas 128 se pueden ver desde el extremo superior 106 del micropocillo 102, por ejemplo, a través del microcanal 104 y de una cubierta superior 124 que se puede fabricar con un material transparente tal como vidrio o plástico, o se pueden ver desde el extremo inferior 108 del micropocillo, por ejemplo, donde la vista no esté obstaculizada.

9. Retención estable en el menisco

Sorprendentemente, las partículas, incluidas las células vivas, se mantienen estables en el menisco cuando el campo eléctrico se desactiva, y mientras el fluido fluye continuamente por el microcanal y, por lo tanto, en los micropocillos. Se ha encontrado sorprendentemente que las células dispuestas en el menisco no son expulsadas durante los lavados con fluido ni durante los cambios en los medios en ausencia de un campo eléctrico, asumiendo un dimensionamiento adecuado del micropocillo. Esta retención estable permite la eliminación de fluidos nocivos, por ejemplo, tampones y reactivos necesarios para manipulaciones DEF, y permite la sustitución por tampones frescos y medios de cultivo más adecuados para el mantenimiento y la vitalidad de las partículas biológicas depositadas y/o más adecuados para procedimientos analíticos particulares dentro del micropocillo.

Se puede conseguir una retención estable en el menisco si la tensión de cizalla inducida por la componente horizontal de la velocidad del fluido es relativamente baja o nula en el nivel inferior del micropocillo. Al cambiar la relación relativa entre el diámetro y la profundidad de los micropocillos cerrados, la componente horizontal de la velocidad del fluido cambia también, como se explica en Han *et al.*, 2010, "Integration of single oocyte trapping, in vitro fertilization and embryo culture in a microwell-structured microfluidic device", Lab on a Chip, vol. 10, n.º 21, pp. 2848-2854. Se observa un comportamiento similar en micropocillos abiertos invertidos en los que el lado inferior presenta un menisco entre el aire y el fluido.

En un modo de realización, los micropocillos están dimensionados para garantizar una profundidad igual o mayor que el diámetro. Por ejemplo, se considera una profundidad de 100 micras o más para un diámetro de 75 micras. Este tamaño de micropocillos permite mantener una velocidad de fluido horizontal de menos de 1 micra/s para una velocidad promedio del fluido de 2,5 mm/s en el microcanal.

Un suministro continuo de nutrientes en el tampón o medio que fluye por el microcanal, así como la eliminación de catabolitos producidos por las células, son posibles en el sistema de micropocillos abiertos invertidos y ayudan a mantener la viabilidad de las células u otras partículas dispuestas en el micropocillo. Además, la exposición a la atmósfera fuera del dispositivo en el extremo inferior abierto del micropocillo permite el intercambio de gases, contribuyendo al mantenimiento de la salud y la viabilidad de la partícula o partículas contenidas en el micropocillo abierto.

Sorprendentemente, en el sistema de micropocillos abiertos invertidos, una combinación de características, incluyendo un volumen pequeño, retención estable, intercambio eficiente de tampones y medios, intercambio eficiente de gases y la capacidad de manipular y focalizar las células en una posición deseada con un uso mínimo de fuerzas electromagnéticas, permite no sólo el uso eficiente del sistema para evaluar las características de las células individuales, sino también para retener, reutilizar y recuperar las células originales para la expansión clonal.

10. Recuperación del contenido del micropocillo

En un modo de realización, el contenido del micropocillo se puede recuperar, por ejemplo, alterando la tensión superficial en el menisco. La alteración de la tensión superficial se puede lograr, por ejemplo, aplicando un pulso de presión al microcanal 104, por ejemplo, desde una bomba 132 o una fuente de aire presurizado, y similares, con una presión que varía de 0,5 bar a 3 bar y una duración de pulso que varía de 1 milisegundo a 100 milisegundos. El contenido del micropocillo se libera, por ejemplo, como una gotita 138 que contiene, por ejemplo, una sola partícula, célula o clúster de partículas o células en el fluido del micropocillo, en un recipiente adecuado 126, por ejemplo, un depósito, una placa de microvaloración, un sistema de vial de recogida, una superficie de captura y similares, colocados debajo del micropocillo 102 (figura 4, 5). En un modo de realización, el recipiente 126 puede incluir un ajustador o membrana para separar las partículas del fluido recuperado del micropocillo 102.

En un modo de realización, el fluido que rodea una partícula 128 en el micropocillo se puede concentrar por evaporación antes de recuperarlo del micropocillo. Por ejemplo, reemplazar el fluido del microcanal por aire o un gas adecuado puede dar como resultado un volumen reducido en el micropocillo, ya que la evaporación ocurrirá en el extremo inferior 108 del micropocillo abierto al aire o al gas. La aplicación de presión al aire/gas del microcanal puede causar la liberación del fluido concentrado en el micropocillo para ser liberado en el recipiente

En un modo de realización, el micropocillo contiene una membrana semipermeable 134 en o cerca de la interfaz aire-fluido en el extremo inferior del micropocillo, con la membrana reteniendo la partícula o partículas. En este modo de realización, el fluido se puede recuperar de cada micropocillo 102 en el recipiente o recipientes 126.

En caso de que el dispositivo 101 contenga una pluralidad de micropocillos, el contenido de múltiples pocillos se puede transferir a un conjunto igual de múltiples recipientes en paralelo, por ejemplo, a múltiples pocillos de una placa de microvaloración.

Durante la transferencia de una célula desde el micropocillo, puede ser posible que otras células o partículas queden atrapadas en el microcanal y puedan ser transferidas junto con la célula o células en el micropocillo cuando se aplica el pulso de presión. Para limitar este problema, antes del uso se puede añadir a los microcanales un recubrimiento de albúmina de suero bovino (BSA) u otro recubrimiento anti-fricción estática, por ejemplo, una capa de pasivación orgánica tal como una monocapa auto-ensamblada (SAM) de ácido graso fluorado o un alquilhalosilano.

Ejemplos

La invención se puede entender mejor con referencia a los Ejemplos siguientes. Estos ejemplos pretenden describir modos de realización ejemplares específicos de la invención y no pretenden limitar el alcance de la invención.

EJEMPLO 1

Análisis de geometrías de microcanales y micropocillos fabricados

1.1 Fabricación

Se creó un dispositivo que contenía una pluralidad de micropocillos abiertos perforando orificios a través de un sustrato de placa de circuito impreso (PCB) flexible multicapa. Las dimensiones de los micropocillos se variaron para analizar la efectividad de geometrías específicas de los micropocillos. En este estudio, el diámetro de los orificios perforados varió de 70 µm a 150 µm, el grosor de la PCB era de entre 75 µm y 350 µm, y cada dispositivo incluía una matriz de 6 x 6 u 8 x 8 orificios. Las implementaciones preferentes se prepararon como se muestra a continuación en la tabla 1 con el fin de interconectar directamente el conjunto de micropocillos abierto con placas de microvaloración estándar y de realizar fácilmente la recuperación y transferencia de células en pocillos de microvaloración.

Los microcanales 104 que tienen un grosor comprendido entre 30 µm y 200 µm y una anchura que varía de 200 µm a 1 mm se fabrican de poliimida, en el lado superior de la pluralidad de micropocillos 102, dispuestos por encima del extremo superior 106 de los micropocillos. Se formó una cubierta de canal 124 de policarbonato transparente, que tenía un grosor de 750 µm, por adherencia sobre el microcanal.

Tabla 1. Características de los conjuntos de micropocillos

Número de micropocillos	Filas x Columnas	Paso pocillo-pocillo y canal-canal
24	6 x 4	18 mm
96	12 x 8	9 mm
384	24 x 16	4,5 mm
1536	48 x 32	2,25 mm

Las paredes del microcanal se fabricaron en poliimida y se unieron a una cubierta superior usando un adhesivo curado adecuadamente a una temperatura de 70 °C durante 2 horas hasta una noche, con el fin de garantizar la biocompatibilidad del adhesivo o usando un adhesivo laminado a temperatura ambiente y después recubriendo con BSA 1 mM para garantizar la biocompatibilidad.

En un modo de realización alternativo, una película de polímero fotosensible (Ordyl SY550, Elga Europe) que tenía un grosor de 55 µm se unió a una cubierta superior de vidrio y se estructuró para crear el microcanal, antes de unirlo a la PCB flexible subyacente que contenía los micropocillos perforados. Se formaron orificios en la cubierta superior para proporcionar conexiones fluidicas de entrada y salida o depósitos de fluido incrustados. Los orificios tenían un diámetro de aproximadamente 0,45 mm.

Se insertó un fluido o un fluido que contenía células y partículas en cada microcanal usando una bomba peristáltica (Watson Marlow 101U/R) conectada como se muestra en la figura 5 en un estudio y utilizando una bomba de jeringa conectada a la entrada del microcanal (KDS-210, KD Scientific, Holliston, MA) en otro. El flujo de fluido varió entre 1 microlitro/hora y 20 microlitros/minuto dependiendo de la sección del canal y de la operación específica que se va a ejecutar sobre las partículas. Las fugas de fluido desde el extremo inferior de los micropocillos se evitaron mediante fuerzas capilares que actúan en los micropocillos. En algunos casos se añadió un recubrimiento hidrófobo (Certonal® FC-732) sobre la superficie inferior del dispositivo para aumentar la resistencia a las fugas de fluido. Como resultado, el sistema fluídico proporciona fluido en el microcanal que sorprendentemente llena los micropocillos sin fugas desde el extremo inferior.

1.2 Análisis de las células depositadas por gravedad

Se suspendieron células vivas K562 (células de leucemia mielógena humanas inmortalizadas) en solución fisiológica (NaCl al 0,9 % p/v o PBS) a una concentración de $1,6 \times 10^6$ células/mililitro y se insertaron en un microcanal de un dispositivo de micropocillos invertidos utilizando una bomba peristáltica. La anchura del microcanal era de 600 μm y la altura era de 55 μm , y cada micropocillo tenía un diámetro de 70 μm .

La bomba de entrada se ajustó para operar en ciclos en los que cada ciclo estaba compuesto de dos fases. Durante la fase 1, el fluido estuvo activo durante 1 minuto a una velocidad de 9 microlitros por minuto, mientras que durante la fase 2 la bomba se desactivó durante un período de 1 minuto y 30 segundos. Durante la fase 1, las células fluyeron por el canal a lo largo de trayectorias aleatorias. Al comienzo de la fase 2, las células estaban estacionarias en el canal en lugares aleatorios. Durante la fase 2 se permitió que un cierto número de células entraran en cada micropocillo por sedimentación.

Utilizando un microscopio invertido, se verificó el contenido de cada pocillo y se detectó la posible presencia de una célula en el micropocillo como consecuencia de la sedimentación. Los resultados demostraron que es posible controlar la distribución de las células que entran en los micropocillos ajustando la concentración celular. En la condición descrita en el presente documento se obtuvo la distribución reportada en la tabla 2.

Tabla 2. Eficiencia de carga de células en micropocillos (total de 41 muestras)

Número de células cargadas	Frecuencia
0	51 %
1	42 %
2+	7 %

El resultado de la fase de carga demostró que se puede depositar una célula individual o múltiples células en un micropocillo que llega a la interfaz de fluido de aire en el extremo inferior abierto y pueden permanecer allí atrapadas y vivas y sin romper la tensión superficial del menisco. En esos micropocillos en los que no se aplicó más fuerza que la gravedad a las células durante su descenso en el micropocillo, la posición de la célula o células depositadas sobre el menisco de fluido fue aleatoria (ver figura 6A).

1.3 Análisis de las células depositadas por alineación focalizada y gravedad

Usando dos o más electrodos, como se muestra en la figura 2, es posible generar una fuerza dielectroforética que actúa sobre las partículas dentro del micropocillo y manipular las partículas a lo largo de un eje vertical del pocillo durante su descenso desde la entrada desde el microcanal 104 en el extremo superior abierto 106 del micropocillo hasta el extremo abierto inferior 108. En cada par de electrodos adyacentes 116, 118, 120, un primer electrodo se conecta a una señal sinusoidal, mientras que un segundo electrodo se conecta a tierra o a la misma señal sinusoidal con una rotación de fase de 180 grados.

Se construyó y utilizó un sistema de micropocillos invertidos para este estudio, que tenía las características del sistema mostrado en la figura 2. El micropocillo 102 tenía un diámetro entre 100 μm y 120 μm y la separación vertical entre cada par de electrodos anulares 116, 118, 120 era de 50 μm .

Se suspendieron células K562 en una mezcla 1:9 de PBS y glicerol (300 mM). Los electrodos 116 y 120 se conectaron al mismo voltaje sinusoidal con una frecuencia típica incluida entre 80 kHz y 100 kHz. La amplitud del voltaje aplicado varió entre 3,4 V y 15 V. El electrodo 118 estaba fijado a tierra. Como resultado de la carga de cuatro células en el micropocillo manteniendo el campo eléctrico activado, cada una de las células fue forzada efectivamente a alinearse a lo largo del eje central del micropocillo. Al alcanzar el menisco aire-fluido en el extremo inferior del micropocillo, cada célula se colocó centralmente y en contacto con la célula o células cargadas anteriores. La agregación se debe a una combinación de la fuerza de gravedad vertical y la componente horizontal de la fuerza dielectroforética.

El micropocillo abierto se observó bajo un microscopio invertido 140 bajo condiciones de fluorescencia. Cuando los electrodos en el pocillo se polarizaron apropiadamente, una o más células se focalizaron en un eje central del micropocillo. Las células, alineadas durante el descenso a lo largo del eje central, se depositaron centralmente sobre el menisco 122 del micropocillo, formando un agregado en la interfaz aire-fluido y dando como resultado el contacto entre células.

Las células K562 se marcaron con un colorante fluorescente y se observaron bajo un microscopio invertido. Como se muestra en la figura 6, mientras que las células estaban depositadas aleatoriamente en el menisco del micropocillo por gravedad cuando no se aplicó campo eléctrico (6A), las mismas células depositadas por combinación de gravedad vertical y fuerza dielectroforética formaron un agregado de partículas depositadas en una porción central del menisco (6B).

1.4 Análisis de las micropérlas depositadas por alineación focalizada y gravedad

Las micropérlas de poliestireno con un diámetro de 10-25 μm se suspendieron en agua desionizada o glicerol a 22,5 mM y se suministraron por gravedad a micropocillos que tenían un diámetro de aproximadamente 80 μm . Los electrodos 116 y 118 se conectaron al mismo voltaje sinusoidal con una frecuencia de 100 kHz. El electrodo 117 estaba fijado a tierra. Se analizó la focalización de agregados de 2 pérlas y los resultados, que muestran la distancia promedio entre pérlas y el número relativo de contactos de perla-perla creados en función de la amplitud de la señal, se presentan en la tabla 3.

Tabla 3

Amplitud de voltaje (V)	Distancia promedio (μm)	Tasa de contactos perla-perla
2	7,2	33 %
4	2,2	90 %

1.5 Etiquetado en chip de las células atrapadas en el menisco

El impacto del cambio de fluido del microcanal sobre el fluido que rodea las células atrapadas en el menisco en el extremo distal del micropocillo abierto se analizó para determinar la capacidad del sistema de micropocillos abiertos invertidos para proporcionar una función de centrifugación de una célula individual. Se ejecutó un protocolo de tinción con calceína en células K562.

Las células K562 se suministraron a micropocillos abiertos invertidos mediante dilución y sedimentación limitadas. Después del suministro de células al menisco, el microcanal se enjuagó haciendo fluir PBS por el microcanal durante cinco minutos. Un tampón que contiene calceína (1 mM en NaCl al 0,9 % p/v), una molécula trazadora que se vuelva fluorescente cuando es captada por las células, se hizo fluir continuamente por el microcanal durante 40 minutos a un caudal constante de 9 microlitros por minuto. La tabla 4 muestra el perfil dinámico de la intensidad de fluorescencia monitorizada en células individuales dentro de los micropocillos.

La tinción celular fue eficaz y demostró la difusión de la calceína desde el microcanal hacia el micropocillo y hasta las células retenidas de forma estable. Las células quedaron sorprendentemente retenidas en el menisco después de los lavados, y eran viables, como se demuestra por la captación de calceína. La monitorización de la captación de calceína en células individuales permitió observar diferentes perfiles de captación. En promedio, la captación máxima se alcanzó después de 30-40 minutos. La intensidad de fluorescencia se muestra en la tabla 4.

Tabla 4

Tiempo (minutos)	Célula 1	Célula 2	Célula 3	Promedio	CV %
2	5,8	4,2	19,0	9,6	84
4	7,9	13,1	24,3	15,1	55
6	7,7	17,8	30,3	18,6	61
8	10,9	22,4	33,6	22,3	51
10	14,2	27,6	37,4	26,4	44
12	19,7	32,5	41,4	31,2	35
14	23,9	37,0	44,4	35,1	30
16	28,9	39,5	47,5	38,7	24
20	38,9	45,4	53,3	45,9	16

25	52,3	58,7	65,4	58,8	11
30	61,9	62,5	63,5	62,6	1
40	74,0	60,5	44,6	59,7	25

EJEMPLO 2

2.1 Recuperación de las células K562 después del suministro y la focalización DEF

5 El uso del sistema de micropocillos abiertos invertidos para el análisis de la función de una célula individual permite la recuperación de las células en la que se ha determinado que tienen las propiedades deseadas. Después de atrapar células individuales y/o partículas, por ejemplo, cada una en una de una pluralidad de micropocillos, por ejemplo en un conjunto de micropocillos, la función celular se puede analizar mediante uno o más bioensayos.

10 Cuando se identifica una célula particular que tiene una o más características o funciones deseadas, el contenido de cada micropocillo se puede recuperar y transferir a un sustrato tal como una placa de microvaloración.

15 Se desarrolló un dispositivo que tiene las características mostradas en la figura 5 para permitir la recuperación de las células del micropocillo abierto invertido. Para liberar el contenido de los micropocillos, se introduce un gas filtrado presurizado, tal como nitrógeno o aire, en el microcanal 104 de una manera controlada. Por ejemplo, se aplicó un pulso de presión de aproximadamente 1 bar a través de una conexión en la entrada de una electroválvula normalmente cerrada 172.

20 Un sistema electrónico conectado a la entrada de control de la electroválvula 172 generó pulsos de voltaje o de corriente con una duración de aproximadamente 5 milisegundos. Durante la generación de un impulso, el gas presurizado entró en el microcanal 104 a través de un tubo que conecta el puerto de entrada y salida de microcanal y, como resultado, una gotita de fluido 138 fue expulsada de cada micropocillo 102 y colocada en un recipiente 126, representado por una superficie de captura en algunos experimentos o por una placa de microvaloración en otros experimentos, en los que la placa se colocó debajo del conjunto de micropocillos y se alineó apropiadamente. Una o

25 más partículas y/o células presentes en el micropocillo se transfirieron a la superficie de captura en gotitas 138 de fluido.

30 Durante la transferencia de una célula desde el micropocillo, puede ser posible que otras células o partículas queden atrapadas en el microcanal y puedan ser transferidas junto con la célula o células en el micropocillo cuando se aplica el pulso de presión. Para limitar este problema, se insertó un recubrimiento de albúmina de suero bovino (BSA) 1 mM en los microcanales durante 30 minutos antes de su uso, con el fin de formar una monocapa auto-ensamblada de proteína. El microcanal se enjuagó con PBS durante 20 minutos antes de la recuperación de las células. Todas las células se habían retirado del microcanal de manera que sólo las células contenidas en el micropocillo se transfirieron al recipiente de recuperación.

35 2.2 Viabilidad y crecimiento de las células recuperadas

40 Una función del sistema de micropocillos invertidos es evaluar la función de una célula individual o células, así como recuperar del micropocillo o expandir dentro del micropocillo las células viables identificadas por tener una propiedad funcional deseada. La viabilidad de células bajo campos eléctricos activados o inactivados y bajo DEF, así como durante diferentes periodos de tiempo, se puede evaluar, por ejemplo, monitorizando el crecimiento y la expansión de células individuales recuperadas o grupos pequeños de células, por ejemplo, haciendo un recuento diario del número de células. El crecimiento celular también se puede monitorizar observando las células bajo un microscopio.

45 Células K562 individuales se suspendieron en medio fisiológico y las células se suministraron a micropocillos por sedimentación y se depositaron en el menisco aire-fluido en una pluralidad de micropocillos. Después de 20 minutos, las células individuales se transfirieron como se ha descrito anteriormente suministrando un pulso de presión al fluido del canal, provocando de este modo la transferencia de una gotita que contenía la célula desde el micropocillo a un pocillo de una placa de microvaloración de 96 pocillos que tenía pocillos en forma de V llenados con medio de crecimiento RPMI suplementado con suero fetal bovino. Después de unas horas de incubación, la célula individual se sedimentó en el pocillo en forma de V, y se observó bajo un microscopio invertido.

50 Las células se incubaron a 37 °C con CO₂ al 5 % y se cultivaron durante varios días. La observación diaria de los cultivos celulares confirmó el crecimiento de una población de células clonales a partir de cada una de las células individuales recuperadas. Después de 3-5 días, se demostró el crecimiento y expansión celular y se generó una línea celular monoclonal a partir de la célula individual depositada. El crecimiento de la célula individual o de pequeños agregados de células se muestra en una serie de fotografías planificadas y se muestra como un gráfico en la figura 8. Este estudio demuestra que la deposición de células sobre el menisco de un micropocillo abierto invertido y la recuperación de las células fue posible, y permitió la recuperación de células viables.

60 EJEMPLO 3

Análisis de las interacciones célula-célula

3.1 Actividad de células LCT frente a células LCL diana

5 Las interacciones funcionales entre células vivas en el sistema de micropocillos invertidos se demostraron por inducción de la lisis celular por los linfocitos T sobre células tumorales diana. Las células diana, células LCL, se marcaron con calceína y se suministraron a micropocillos. Los linfocitos T (LCT) se activaron contra las células diana y se suministraron a los mismos micropocillos. La fluorescencia de las células diana se monitorizó mediante
10 microscopía de fluorescencia y se determinó el perfil de fluoresceína de calceína como una medida de la lisis celular.

Las células LCT activadas indujeron una disminución consistente en la fluorescencia de las células diana en comparación con el control negativo. Como se muestra en la figura 7, durante 20 minutos la fluorescencia observada de la célula diana viva disminuyó y se extinguió, demostrando una lisis eficaz de la célula diana inducida por los
15 LCT; un análisis eficaz de la interacción específica célula-célula inducida y el resultado funcional medido, en cuestión de minutos en el sistema de micropocillos abiertos invertidos.

La tabla 5 informa de la intensidad de fluorescencia medida en varias dianas LCL suministradas en micropocillos abiertos invertidos que tienen un diámetro de 70 μm . Como control suministramos células LCL solas. La interacción LCT-LCL se midió en dos condiciones: sin infección por virus de papiloma humano (VPH) en LCL diana y con
20 infección por VPH. En el primer caso no se esperaba lisis, mientras que en el segundo caso se esperaba que las células LCT reconocieran la diana y lisaran las células LCL. Los resultados informados en la tabla muestran que la intensidad de fluorescencia experimenta una fuerte disminución durante 30 minutos para todos los pares LCT-LCL cuando la LCL se infectó con VPH (casos e-h). Por el contrario, en sólo un caso (d) se obtuvo una lisis no específica, que representa la situación de una célula diana que es reconocida por la célula LCT incluso sin infección por VPH.
25 En todos los demás casos sin infección (a-c) sólo se observó una disminución fisiológica de la señal fluorescente.

Tabla 5

Caso	Tipo de célula	Tiempo (minutos)	Intensidad (relativa)
a	LCL (control)	30	57,9 %
b	LCT-LCL (sin HFV)	20	59,8 %
c	LCT-LCL (sin VPH)	20	88,6 %
d	LCT-LCL (sin VPH)	20	23,8 %
e	LCT-LCL 1	30	2,3 %
f	LCT-LCL 2	20	6,2 %
g	LCT-LCL 3	15	0,0 %
h	LCT-LCL 4	15	4,5 %

30 EJEMPLO 4Suministro controlado de partículas en micropocillos con flujo de fluido activo

35 Se realizaron experimentos para validar la funcionalidad de las estructuras de micropocillos abiertos invertidos mostradas, por ejemplo, en las figuras. Se produjeron dispositivos con micropocillos con un diámetro circular de 100 μm , un dieléctrico con un grosor de 50 μm y 25 μm . El grosor del recubrimiento fue de 9 μm . El hueco 8 entre los electrodos 153 y 154 fue de 50 μm . El micropocillo tenía una altura de 150 μm y una anchura de 350 μm .

40 Se suspendieron microperlas de poliestireno con un diámetro de 10 μm en glicerol (22,5 mM). El glicerol tiene una densidad mayor que el agua y se utiliza para reducir la velocidad de sedimentación, limitando así la adhesión de las microperlas a la superficie inferior del microcanal. Se suspendieron células K562 en una mezcla 1:9 de PBS y glicerol (300 mM). Este tampón tiene una osmolaridad fisiológica mientras que la conductividad se reduce hasta aproximadamente 0,1 S/m.

45 En dos experimentos diferentes se introdujeron microperlas y células en el microcanal y se polarizaron electrodos de control 116, 153, 154, 155, 156, 118 para forzar (atrapar) o impedir (expulsar) el suministro de partículas a los micropocillos. A excepción de los electrodos fijados a tierra, todas las señales eran sinusoides con una frecuencia de 100 kHz y la misma amplitud. El esquema de desplazamiento de fase se presenta en la tabla 6. La funcionalidad de los electrodos de control se determinó mediante un análisis estadístico del número de partículas suministradas a los
50 micropocillos para cada una de las partículas y las células suministradas, como una función de la velocidad de la partícula y del voltaje aplicado.

Tabla 6

Configuración	Electrodo					
	116	153	154	155	156	118
Atrapamiento	(GND)	(GND)	(GND)	0	π	$\pi/2$
Expulsión	(GND)	π	0	0	π	$\pi/2$

5 Cuando la configuración de atrapamiento estaba activa, el número de partículas suministradas a los micropocillos aumentó para amplitudes de señal más altas y velocidades de fluido más bajas. Los resultados detallados se informan en la tabla 7 y la tabla 8, en las que se consideraron al menos 50 muestras por cada valor informado.

10 Cuando la configuración de expulsión estaba activa, encontramos que la estructura funcionó correctamente (es decir, ninguna partícula suministrada) para amplitudes de voltaje cresta a cresta superiores a 2 V y para cualquier velocidad de partícula dentro del intervalo de 15-150 $\mu\text{m/s}$.

15 Normalmente no se utilizan velocidades de flujo inferiores a 15 $\mu\text{m/s}$, ya que dan lugar a una adhesión de las partículas a la superficie inferior del microcanal. La configuración de expulsión proporcionó mayor tensión sobre las células que la configuración de atrapamiento, como se demuestra por los ensayos de liberación de calceína realizados en las células que fluyen a través del canal. Como consecuencia, cuando se trabaja con células, la amplitud de voltaje cresta a cresta se mantiene preferentemente por debajo de 10 V para limitar las tensiones sobre las células y mantener la viabilidad celular.

Tabla 7

Voltaje cresta a cresta aplicado (V)	Velocidad de la partícula y del fluido ($\mu\text{m/s}$)					
	15	20	30	60	100	150
2	58 %	50 %	40 %	0 %	0 %	0 %
4	95 %	95 %	95 %	57 %	0 %	0 %
6	95 %	95 %	85 %	80 %	50 %	0 %
8	95 %	95 %	100 %	72 %	0 %	0 %
10	100 %	100 %	96 %	75 %	10 %	0 %
15	100 %	100 %	96 %	82 %	30 %	0 %
20	100 %	100 %	100 %	90 %	30 %	0 %

Tabla 8

Voltaje cresta a cresta aplicado (V)	Velocidad de la partícula y del fluido ($\mu\text{m/s}$)				
	15	20	30	60	100
10	92 %	87 %	82 %	75 %	30 %
15	97 %	95 %	95 %	85 %	35 %
20	95 %	92 %	91 %	93 %	50 %

EJEMPLO 5

25 Control del entorno fuera del micropocillo abierto invertido para reducir la evaporación y aumentar la viabilidad celular

30 El efecto positivo de controlar el entorno que rodea el micropocillo abierto invertido se demostró configurando un sistema en el que la humedad fuera del micropocillo se llevó a su valor de saturación y midiendo la reducción constante de la fuerza de arrastre debida a la evaporación.

35 La configuración utilizada para controlar la evaporación incluía una placa de microvaloración de 384 pocillos, en la que cada micropocillo se llenó con 100 μl de fluido, tal como agua, RPMI, PBS o cualquier tampón adecuado para el cultivo celular almacenado a una temperatura entre 4 $^{\circ}\text{C}$ y 10 $^{\circ}\text{C}$. El conjunto de micropocillos abiertos invertidos 114 se apoyó sobre la placa de microvaloración de tal manera que cada pocillo de la placa de microvaloración se alineó con un micropocillo abierto invertido, creando una cámara cerrada que contenía el fluido previamente depositado en la placa de microvaloración que se podría evaporar en la cámara cerrada, aumentando así la humedad. La distancia

vertical entre el receptáculo y el menisco 122 del micropocillo abierto invertido varía típicamente entre 0,5 mm y 5 mm. Después de unos minutos, la presión de vapor en la cámara alcanzó su valor de saturación y evitó cualquier evaporación adicional en la placa de microvaloración y en el micropocillo abierto invertido.

- 5 Para demostrar el efecto positivo del control de la humedad bajo el micropocillo en la reducción de la evaporación en el micropocillo, se usó un dispositivo 101 que presentaba micropocillos con la configuración de electrodos mostrada en la figura 2. Los electrodos 116 y 120 se fijaron a tierra, mientras que el electrodo 118 se conectó a una señal sinusoidal que tenía una frecuencia de 100 kHz y amplitud variable.
- 10 Una suspensión de células K562 mantenida a una temperatura entre 30 °C y 37 °C se introdujo en el microcanal y se detuvo el flujo de fluido para tener una célula individual colocada en el microcanal sobre la entrada del micropocillo. En presencia de evaporación, la célula se sometió a una fuerza de arrastre F_A dirigida hacia abajo y, debido al flujo de fluido, producida por evaporación en la interfaz aire-fluido. Además, la célula se sometió a la fuerza de gravedad F_G , a la fuerza de flotación F_F y la componente vertical de la fuerza dielectroforética F_{DEFy} de tal manera
- 15 que:

$$F_F - F_G - F_A = F_{DEFy}$$

- 20 Para un valor relativamente alto de la fuerza dielectroforética, la célula permanece atrapada en la entrada del micropocillo y las fuerzas que actúan sobre la célula resultan estar en equilibrio. Cuando la fuerza dielectroforética disminuye, la posición vertical de la célula disminuye y la célula alcanza una región en la que el campo eléctrico y la fuerza dielectroforética son mayores. Este comportamiento se observa hasta que la amplitud del campo eléctrico alcanza un valor mínimo crítico. Si la amplitud disminuye adicionalmente, entonces la célula cae en el micropocillo, ya que la fuerza dielectroforética no es lo suficientemente fuerte como para contrarrestar las otras fuerzas que
- 25 actúan sobre la célula.

- La posición vertical de la célula de un micropocillo abierto invertido rodeado de aire se comparó con o sin control de humedad. El valor de referencia para la altura fue el lado superior del electrodo superior 116. Los valores positivos de la altura corresponden a partículas que quedan fuera del micropocillo en el microcanal, mientras que los valores
- 30 negativos corresponden a las partículas que entran en el micropocillo. Como se informa en la tabla 9, la altura de la célula fue siempre mayor cuando se controlaba la humedad. Esto demuestra que la fuerza de arrastre F_A adicional debida a la evaporación se eliminó de manera efectiva con la presencia de la disposición que proporcionaba humedad controlada bajo el micropocillo abierto invertido.

35 Tabla 9

Amplitud (V)	Altura de la célula sin control de humedad		Altura de la célula con control de humedad		Altura teórica de la célula
	Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar	
0,66	-28,25	0,00	-6,00	5,96	-5,9
0,75	-14,82	2,60	2,80	2,28	-1,2
0,85	-11,36	5,01	5,20	1,92	2,4
0,945	-7,96	7,42	7,20	1,64	4,9
1,035	-3,50	7,08	10,80	3,83	6,9

- 40 El control de la evaporación es necesario para mantener un entorno fisiológico adecuado para las células atrapadas en el menisco en la interfaz aire-fluido. De hecho, la presencia de evaporación introduciría un aumento en la concentración local de sales y otros nutrientes contenidos en el medio con un consiguiente aumento de la presión osmótica. Después de aplicar el control de la evaporación, se midió la viabilidad celular con un ensayo estándar de liberación de calceína en el que las células se tiñeron con calceína 1 μM y se obtuvo una pérdida de señal de aproximadamente un 8 % por hora, que es comparable a la pérdida fisiológica bien conocida, Neri *et al.*, 2001, Clin. Diagn. Lab. Immunol., vol. 8, n.º 6, pp. 1131-1135 "Calcein-Acetyoxymethyl Cytotoxicity Assay: Standardization of a Method Allowing Additional Analyses on Recovered Effector Cells and Supernatants".

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir un agregado de partículas específicas, que comprende:

5 a) insertar un primer grupo de partículas (128) en un fluido (130) contenido en un microcanal (104) de un sistema de micropocillos abiertos invertidos (100), en el que dicho sistema de micropocillos abiertos invertidos (100) comprende uno o más micropocillos (102) que tienen un extremo superior abierto (106) y un extremo inferior abierto (108), en el que el extremo superior (106) está abierto a uno o más microcanales (104) que tienen un área en sección transversal de dimensiones micrométricas para el suministro de fluido (130) y de partículas (128) al micropocillo (102), y en el que el extremo inferior (108) está abierto a la atmósfera fuera del sistema de micropocillos abiertos invertidos (100), tal como aire u otro gas, y comprende además puertos de entrada y salida de fluido;

15 en el que dicho micropocillo (102) tiene dimensiones micrométricas y está dimensionado para garantizar una profundidad igual o mayor que su diámetro;

b) suministrar una o más partículas (128) de dicho primer grupo de partículas (128) desde dicho microcanal (104) a uno o más micropocillos (102);

20 c) depositar la una o más partículas suministradas (128) en una posición sobre un menisco (122) formado en la interfaz atmósfera-fluido en el extremo inferior abierto (108) del uno o más micropocillos (102); y

25 d) repetir las etapas a), b) y c) de inserción y depósito, según sea necesario, para formar un agregado deseado de partículas específicas situadas en el menisco del micropocillo, en el que las partículas suministradas descienden desde el extremo superior del micropocillo hasta el menisco en el extremo inferior del micropocillo por fuerza gravitatoria; y

en el que el agregado formado queda retenido de manera estable en el menisco durante el flujo de fluido por el microcanal.

30 2. El método de la reivindicación 1, en el que dicho sistema de micropocillos abiertos invertidos (100) comprende además uno o una pluralidad de electrodos (116, 118, 120) en dicho micropocillo (102) y/o uno o una pluralidad de electrodos (155, 156, 153, 154) en dicho microcanal (104) y el descenso de las partículas suministradas (128) a la posición en la que se encuentra dicho menisco (122) es accionado por:

35 a) una combinación de fuerza gravitatoria y uno o más campos eléctricos generados entre dichos electrodos (116, 118, 120) dispuestos en dicho micropocillo (102); o

40 b) una combinación de fuerza gravitatoria y uno o más campos eléctricos generados entre al menos un electrodo dispuesto en el micropocillo (102) y al menos un electrodo dispuesto en la porción superior del micropocillo (102), por encima del micropocillo (102), y/o en el microcanal (104).

3. El método de la reivindicación 1, en el que las partículas incluyen células vivas, partículas no vivas que comprenden moléculas biológicas o una combinación de las mismas.

45 4. El método de la reivindicación 1, en el que, durante al menos parte del descenso de la una o más partículas (128) hasta el menisco (122) en el extremo inferior abierto (108) del micropocillo (102), un campo eléctrico sostiene la o las partículas en una posición central en un eje horizontal (111) del micropocillo a medida que la partícula desciende a lo largo del eje vertical (110) del micropocillo, de manera que las partículas suministradas al mismo micropocillo están en estrecha proximidad en el menisco (122) .

50 5. El método de la reivindicación 1, que comprende además la etapa de controlar la entrada de una o más partículas en un micropocillo mediante:

55 a) control del flujo de fluido por el microcanal a una velocidad suficientemente baja para permitir que la una o más partículas entren en el micropocillo;

b) activación de un par de electrodos dispuestos en el extremo superior del micropocillo para controlar la entrada de una o más partículas en el microcanal; o

60 c) ambos controlan el fluido como en a) y activan los electrodos como en b).

6. El método de la reivindicación 1, en el que las partículas son células, que comprende además una o más de las etapas siguientes:

65 a) analizar las partículas depositadas para detectar una respuesta funcional detectable;

- b) visualizar una o más de las partículas depositadas bajo un microscopio; y
- c) recuperar una o más células del micropocillo.
- 5 7. El método de la reivindicación 1, en el que se depositan dos o más partículas que son células que forman un agregado funcional, en el que el agregado comprende las células en contacto directo o en estrecha proximidad y que comprende además la etapa de analizar el agregado para detectar una respuesta funcional.
- 10 8. El método de la reivindicación 6 o 7, en el que la respuesta funcional se selecciona entre:
- a) unión ligando/receptor;
- b) lisis de células diana;
- 15 c) inhibición del crecimiento celular;
- d) estimulación o inhibición de la apoptosis;
- e) producción de un biomarcador.
- 20 9. El método de la reivindicación 1, que comprende además una o más de las siguientes etapas: a) visualizar una o más de las partículas que son células retenidas de forma estable en el menisco (122) bajo un microscopio (140) situado por debajo del extremo inferior abierto (108) del micropocillo abierto invertido (102) o por encima del microcanal (104);
- 25 b) recuperar una o más células del micropocillo abierto invertido (102) aplicando un pulso de presión en el microcanal (104) que da como resultado la transferencia del contenido del micropocillo abierto invertido (102) a un sustrato dispuesto por debajo del extremo inferior abierto (108) del micropocillo abierto invertido (102); y/o
- 30 c) recuperar el contenido del micropocillo abierto invertido (102) directamente sobre un sustrato dispuesto debajo del extremo inferior abierto (108) del micropocillo abierto invertido (102).
10. El método de la reivindicación 1, en el que el sistema de micropocillos abiertos invertidos (100) comprende una pluralidad de micropocillos abiertos invertidos (102).
- 35 11. El método de la reivindicación 10, en el que la pluralidad de micropocillos abiertos invertidos (102) comprende un conjunto de micropocillos (102) abiertos en el extremo superior (106) al mismo microcanal (104), y que comprende además la etapa de transferir el contenido de múltiples micropocillos abiertos invertidos (102) en paralelo a un sustrato de pocillos múltiples.
- 40 12. El método de la reivindicación 10, en el que la pluralidad de micropocillos abiertos invertidos (102) comprende un conjunto de micropocillos abiertos invertidos (102) abiertos en el extremo inferior (108) a una atmósfera fuera del dispositivo en la que se controla la composición, la humedad, la presión y la esterilidad.
- 45 13. El método de la reivindicación 1, en el que el suministro de la una o más partículas comprende además:
- a) aplicar un potencial controlado a electrodos enfrentados dispuestos en la parte superior e inferior del microcanal para crear una fuerza dielectroforética suficiente para hacer que una partícula situada en el microcanal se desplace hacia un micropocillo; y
- 50 b) aplicar un potencial controlado a electrodos enfrentados dispuestos en el extremo superior del micropocillo y en la parte superior del microcanal para crear una fuerza dielectroforética suficiente para hacer que una partícula se desplace dentro del micropocillo.
- 55 14. El método de la reivindicación 1, en el que el suministro de la una o más partículas comprende:
- a) aplicar un potencial controlado a electrodos enfrentados dispuestos en la parte superior e inferior del microcanal para crear una fuerza dielectroforética suficiente para hacer que una partícula situada en el microcanal se desplace hacia fuera de un micropocillo; y
- 60 b) aplicar un potencial controlado a electrodos enfrentados dispuestos en el extremo superior del micropocillo y en la parte superior del microcanal para crear una fuerza dielectroforética suficiente para hacer que una partícula sea repelida del micropocillo.
- 65 15. El método de la reivindicación 13 o 14, en el que el microcanal comprende un fluido que contiene partículas que fluyen activamente desde una entrada hacia una salida.

- 5 16. El método de la reivindicación 15, que comprende además la etapa de detectar una ausencia de una partícula en uno o más micropocillos abiertos invertidos (102) utilizando un sensor y la etapa de responder a la ausencia detectada haciendo que los electrodos situados en el extremo superior del micropocillo generen una fuerza dielectroforética para desplazar una o más partículas dentro del micropocillo.
- 10 17. El método de la reivindicación 1, que comprende además la etapa de detectar el paso de una o más partículas por el microcanal (104) usando un sensor óptico o eléctrico situado a lo largo del microcanal; y la etapa de responder a la detección de la una o más partículas haciendo que los electrodos situados en el extremo superior del micropocillo (116) generen una fuerza dielectroforética para desplazar la partícula dentro del micropocillo o para repeler la partícula fuera del micropocillo.
- 15 18. El método de la reivindicación 17, en el que los electrodos enfrentados dispuestos en la parte superior e inferior del microcanal (104) crean una fuerza dielectroforética suficiente para hacer que la una o más partículas del microcanal se alineen a lo largo de un eje en el que el sensor realiza la detección.
19. El método de la reivindicación 1, que comprende:
- 20 a) insertar el primer grupo de partículas (128) en el microcanal (104), en el que una pluralidad de electrodos emparejados (155, 156, 153, 154) están dispuestos en el microcanal (104);
- b) aplicar un potencial a uno o más de los pares de electrodos para generar una serie de campos eléctricos suficientes para hacer que una partícula se desplace por el microcanal (104) hacia un micropocillo (102);
- 25 c) atrapar una partícula situada en el microcanal en una posición por encima del micropocillo;
- d) aplicar un potencial a uno o más pares de electrodos en el microcanal y en el micropocillo para hacer que la partícula entre en el micropocillo; y
- 30 e) permitir que la partícula descienda a lo largo de un eje vertical del micropocillo y se deposite en la posición dentro del micropocillo.
20. El método de la reivindicación 1, que comprende:
- 35 a) insertar las partículas en el microcanal, en el que el microcanal incluye una pluralidad de electrodos emparejados dispuestos en las paredes laterales del micropocillo abierto invertido;
- b) aplicar un potencial a uno o más pares de electrodos para generar una serie de campos eléctricos suficientes para hacer que una partícula se desplace por el microcanal hacia un micropocillo;
- 40 c) atrapar una partícula situada en el microcanal en una posición por encima del micropocillo;
- d) aplicar un potencial a uno o más pares de electrodos en el microcanal y en el micropocillo para hacer que la partícula entre en el micropocillo; y
- 45 e) permitir que la partícula descienda a lo largo de un eje vertical del micropocillo y se deposite en el menisco del extremo inferior del micropocillo.
- 50 21. El método de la reivindicación 1, que comprende además las etapas de:
- a) proporcionar uno o más reactivos a la una o más partículas depositadas en la posición añadiendo el uno o más reactivos al microcanal que está en comunicación fluida con el micropocillo; y
- b) correlacionar un cambio en la una o más partículas depositadas o proporcionar uno o más reactivos con una actividad funcional específica poseída por una o más partículas o por el reactivo.
- 55 22. El método de la reivindicación 1, en el que el fluido del microcanal se puede cambiar repetidamente durante el método.
- 60 23. El método de la reivindicación 20, en el que la una o más partículas depositadas se selecciona entre uno o más de:
- a) una partícula diana que comprende un ligando específico;
- 65 b) una célula diana que comprende un ligando específico;

- c) una célula diana citotóxica y/o citolítica;
 - d) una célula enferma;
 - 5 e) una célula inmunitaria;
 - f) una célula cancerosa;
 - 10 g) una célula infectada por VIH;
 - h) una célula transgénica;
 - i) una célula inmortalizada; y
 - 15 j) un linfocito B.
24. El método de la reivindicación 6 o 21, en el que la respuesta funcional se selecciona entre uno o más de:
- 20 a) unión a un antígeno específico;
 - b) lisis de una célula diana;
 - c) producción de un anticuerpo específico de antígeno;
 - 25 d) efecto terapéutico del fármaco;
 - e) apoptosis de una célula diana;
 - 30 f) inhibición de la muerte celular;
 - g) producción de una molécula biológica específica;
 - h) diferenciación celular; y
 - 35 i) un evento de señalización celular en una célula diana.
25. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que después de dicha etapa d), dicho fluido (130) contenido en el microcanal se reemplaza por aire o por un gas adecuado.
- 40 26. El método de la reivindicación 25, en el que se aplica presión a dicho aire/gas en el microcanal, provocando la liberación del fluido (130) del micropocillo (102) en el recipiente o recipientes (126).
- 45 27. Un sistema de micropocillos invertidos (100) para producir un agregado de partículas específicas de acuerdo con el método de cualquiera de las reivindicaciones 1-26, que comprende uno o más micropocillos (102) que tienen un extremo superior abierto (106) y un extremo inferior abierto (108), en el que el extremo superior (106) está abierto a uno o más microcanales (104) que tienen un área en sección transversal de dimensiones micrométricas para el suministro de fluido (130) y de partículas (128) al micropocillo (102), y en el que el extremo inferior (108) está abierto a la atmósfera fuera del sistema de micropocillos abiertos invertidos (100), tal como aire u otro gas, y comprende además puertos de entrada y salida de fluido, teniendo dicho micropocillo (102) dimensiones micrométricas, en el
- 50 que dicho micropocillo (102) está dimensionado para garantizar una profundidad igual o mayor que su diámetro;
- 55 28. Un sistema de micropocillos invertidos de acuerdo con la reivindicación 27, en el que dicho diámetro de micropocillo es de aproximadamente 70 a aproximadamente 150 micras o de aproximadamente 50 a aproximadamente 100 micras.
- 60 29. Un sistema de micropocillos invertidos de acuerdo con las reivindicaciones 27 o 28, en el que la relación entre dicho diámetro de micropocillo y dicha profundidad de micropocillo es de aproximadamente 1 a 1, de 1 a 1,25, de 1 a 1,5 o de 1 a 2.
- 65 30. Un sistema de micropocillos invertidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 27-29, que comprende además uno o una pluralidad de electrodos (116, 118, 120) en dicho micropocillo (102).
31. Un sistema de micropocillos invertidos de acuerdo con la reivindicación 30, en el que dichos electrodos son electrodos anulares, o en el que un par de electrodos enfrentados rodean el micropocillo.
- 65 32. Un sistema de micropocillos invertidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 27-29, que comprende

además uno o una pluralidad de electrodos (155, 156, 153, 154) en dicho microcanal (104).

33. Un sistema de micropocillos invertidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 27-29, que comprende además uno o una pluralidad de electrodos (116, 118, 120) en dicho micropocillo (102) y uno o una pluralidad de electrodos (155, 156, 153, 154) en dicho microcanal (104).

5

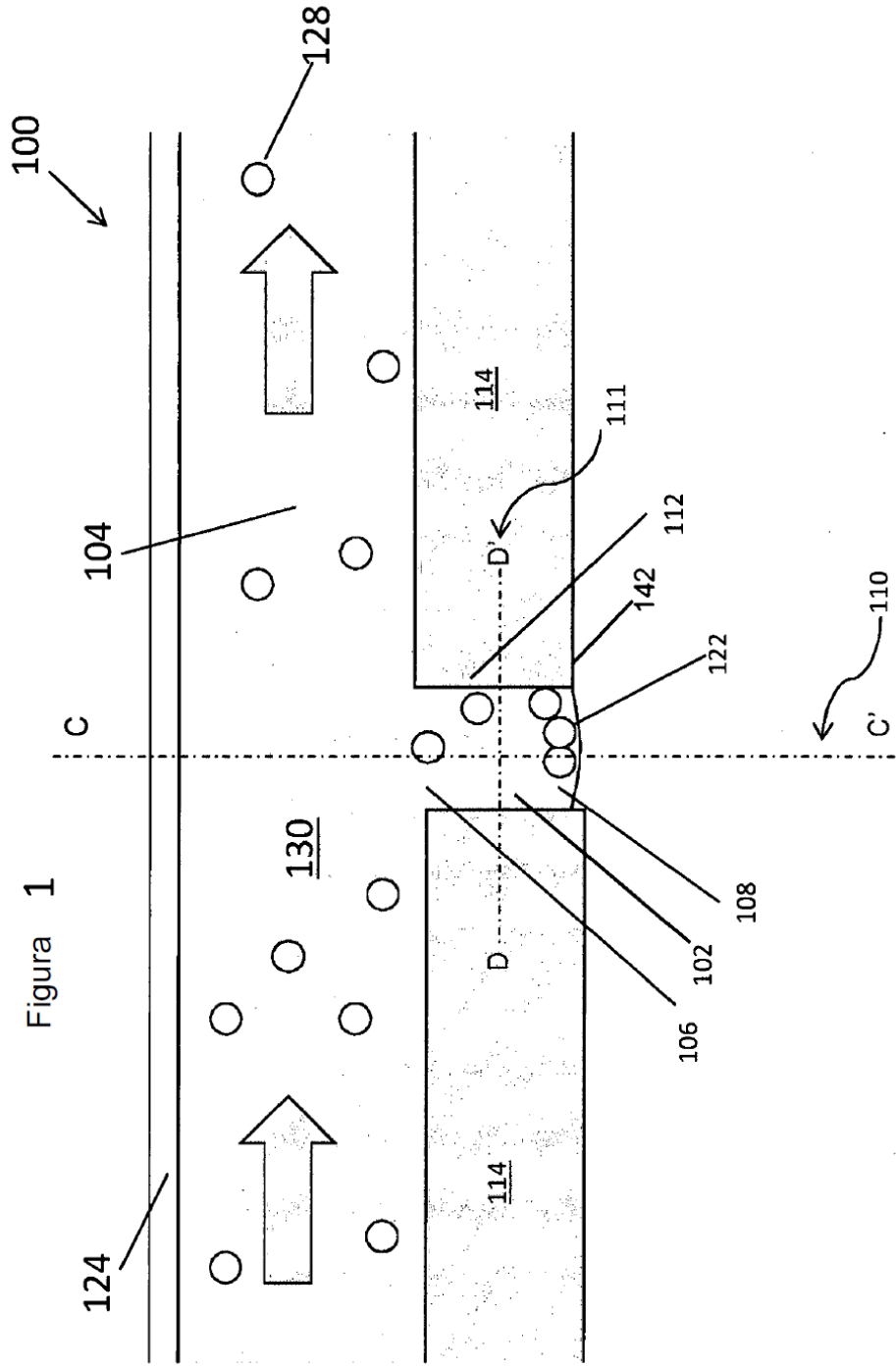


Figure 1

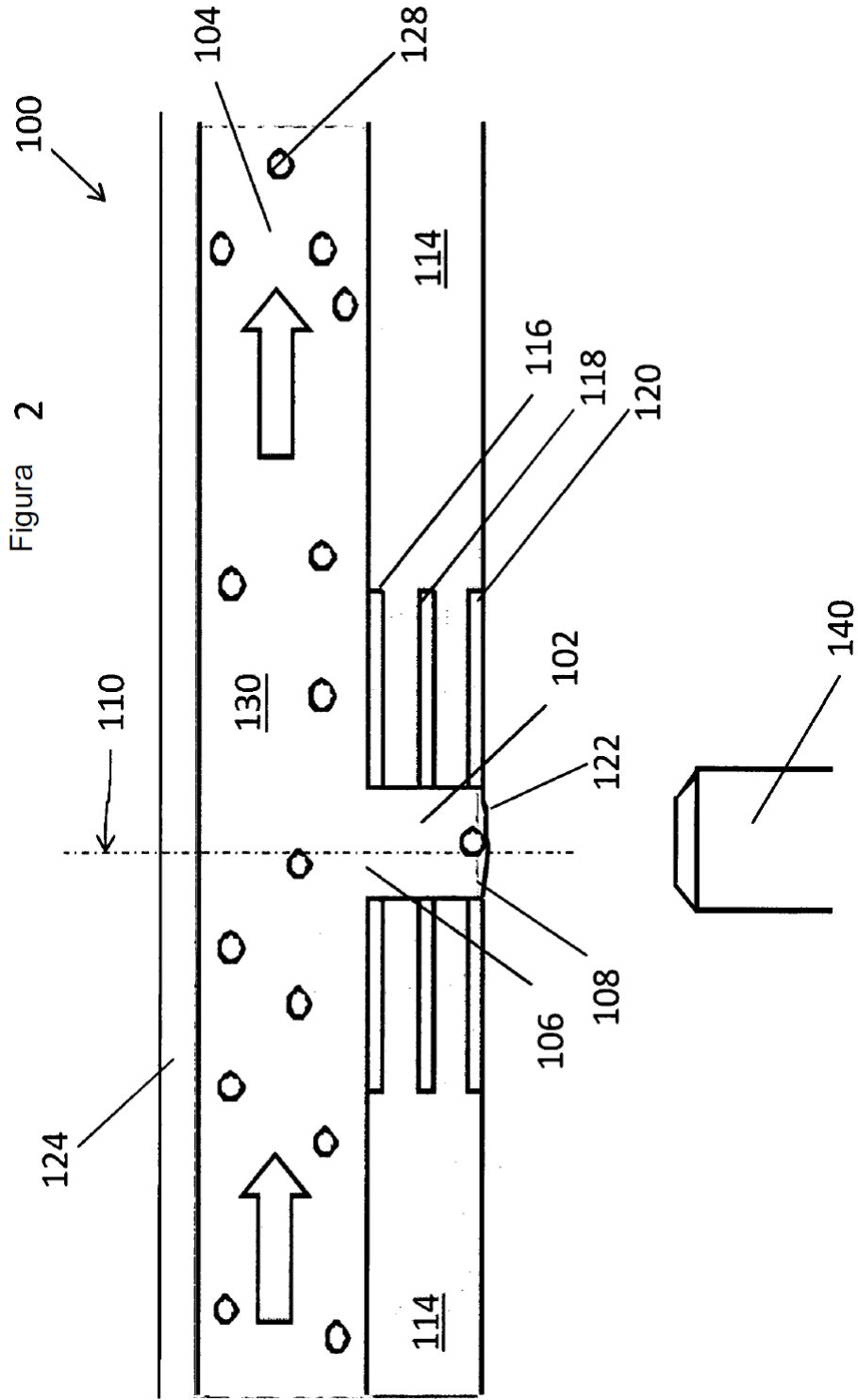


Figura 2

Figura 3

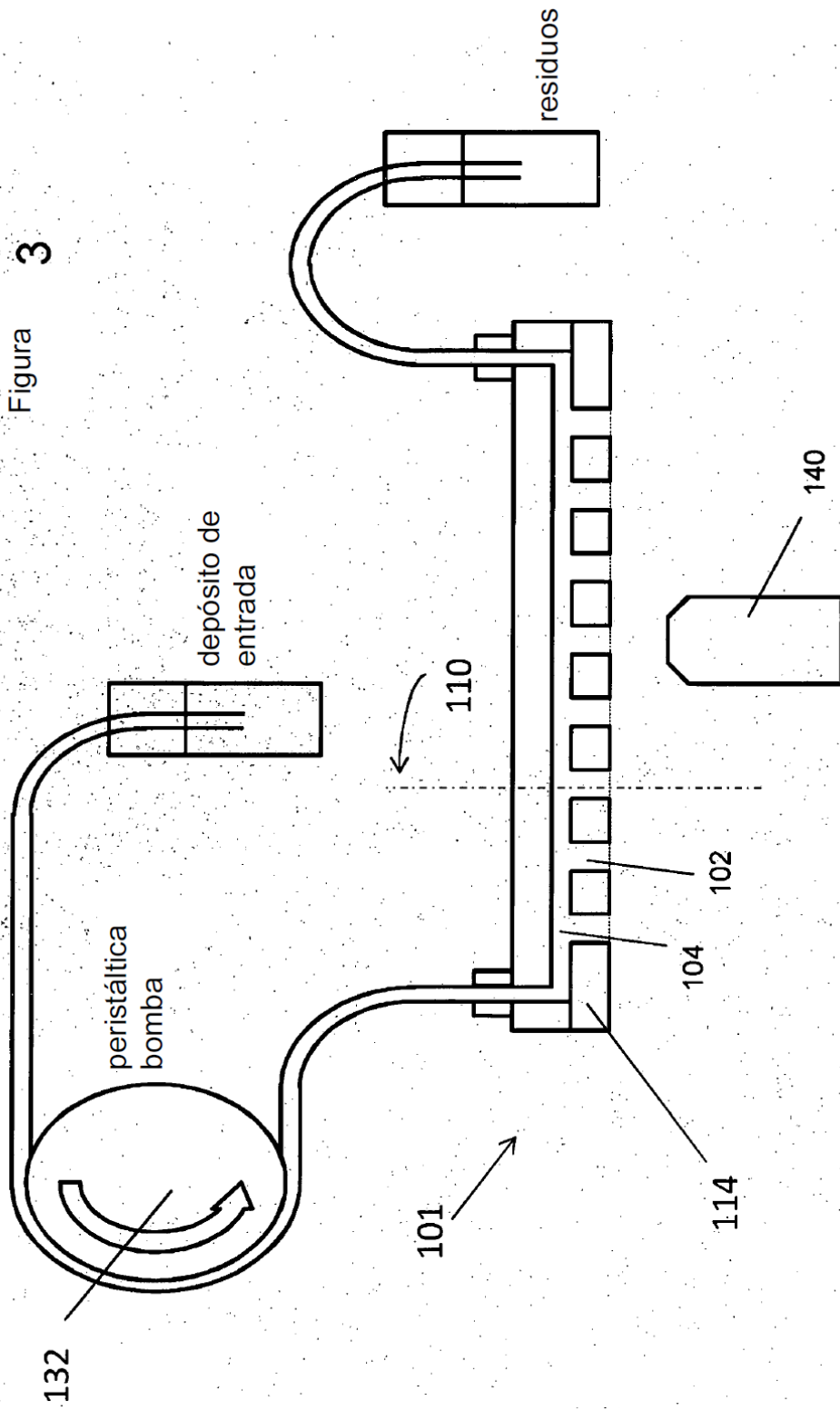
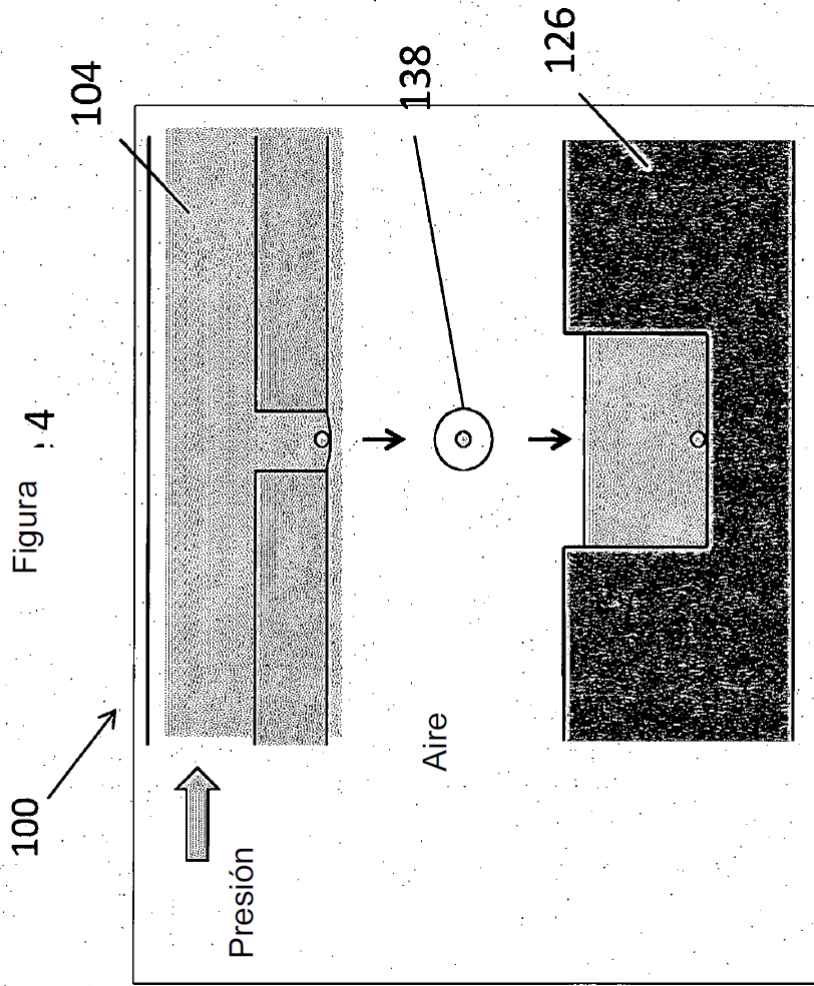


Figura 4



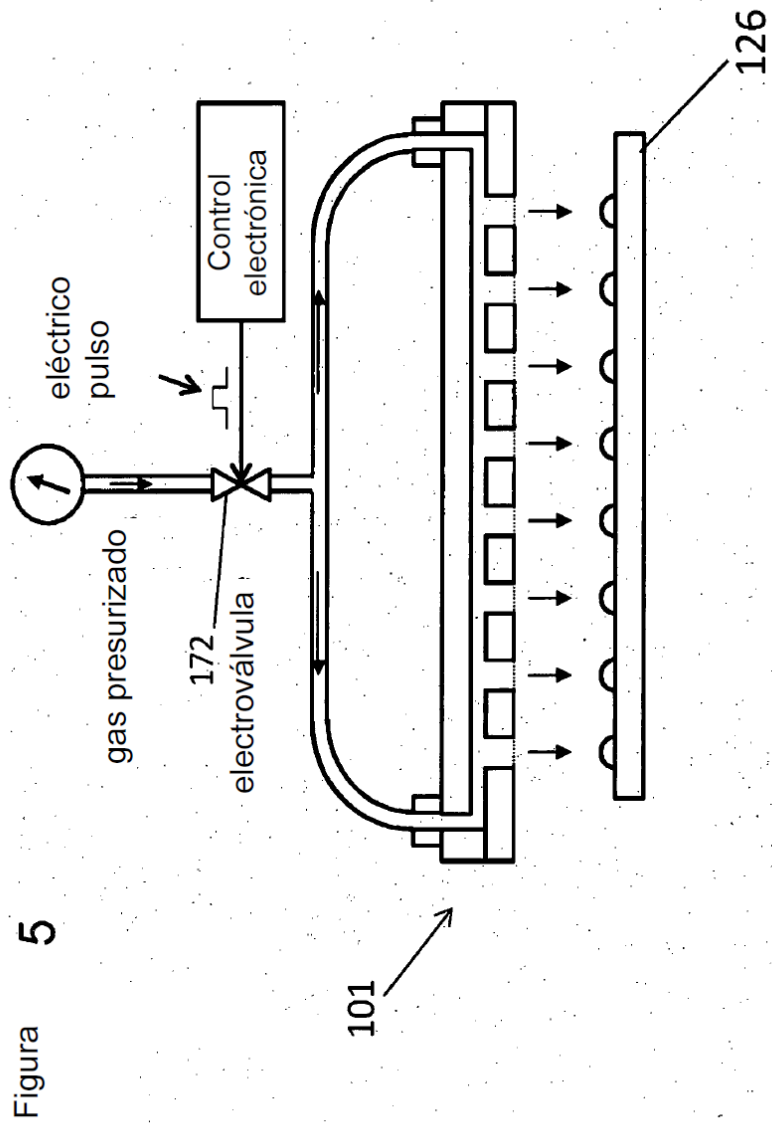


Figura 5

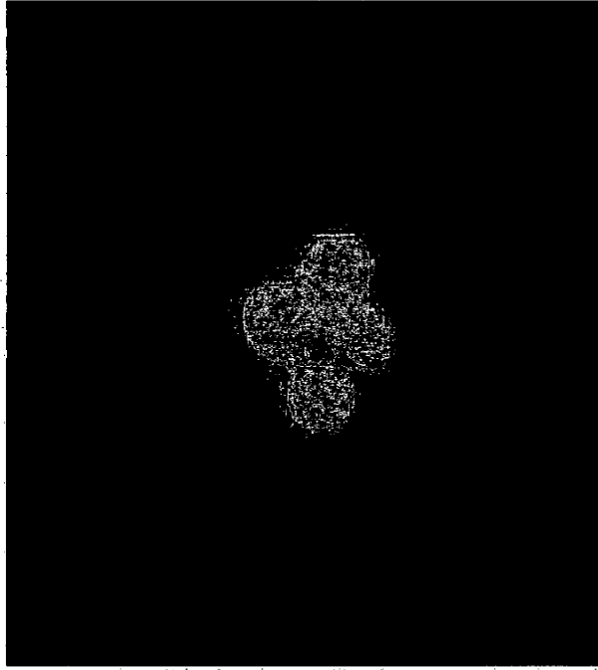


Figura 6B

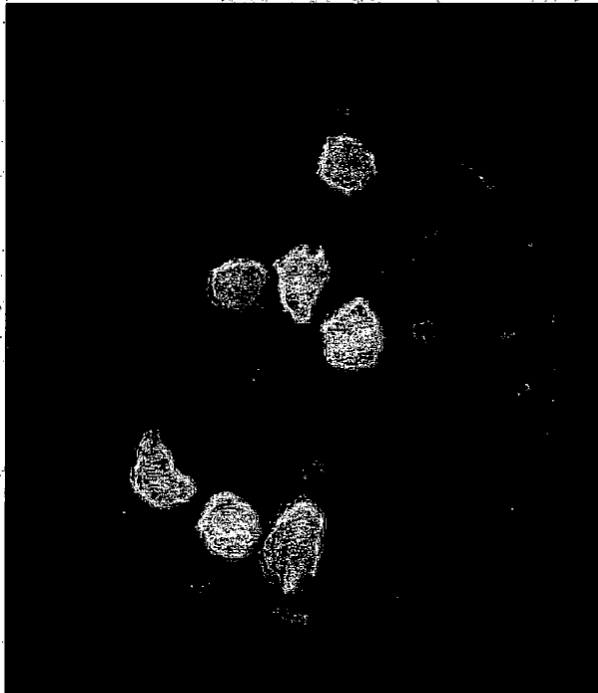
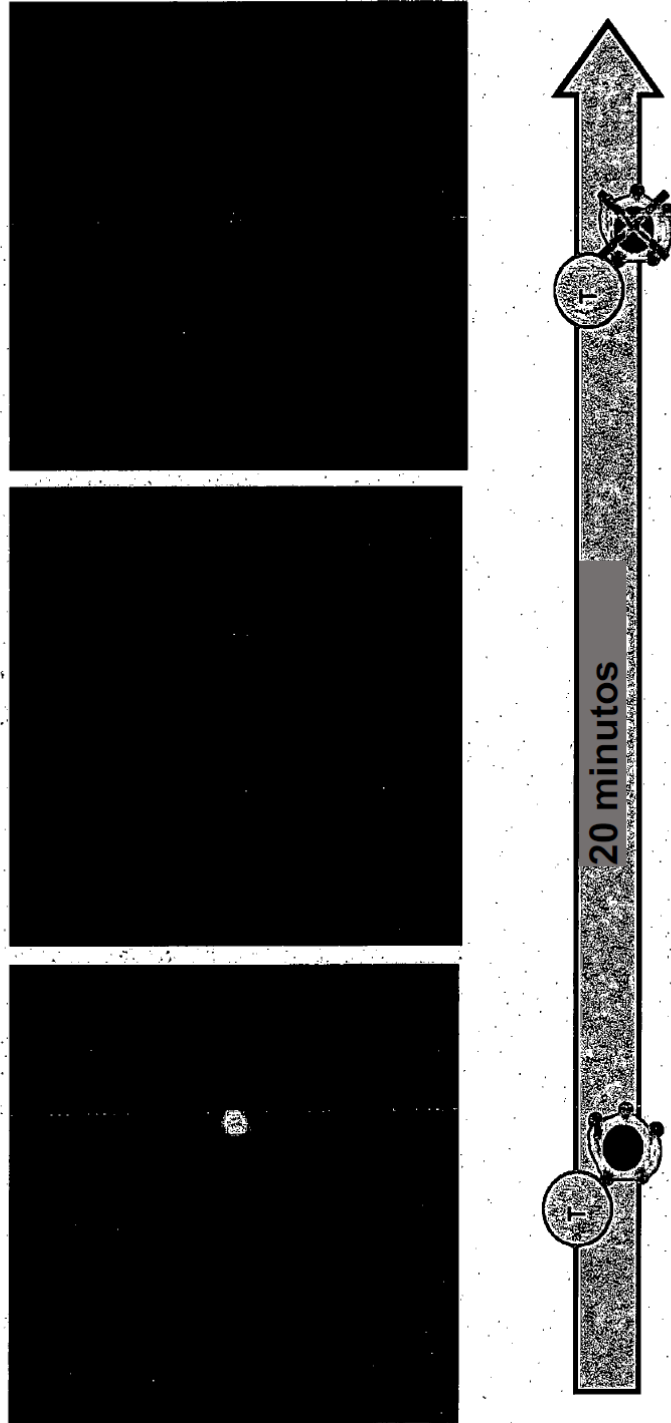


Figura 6A

Figura 7



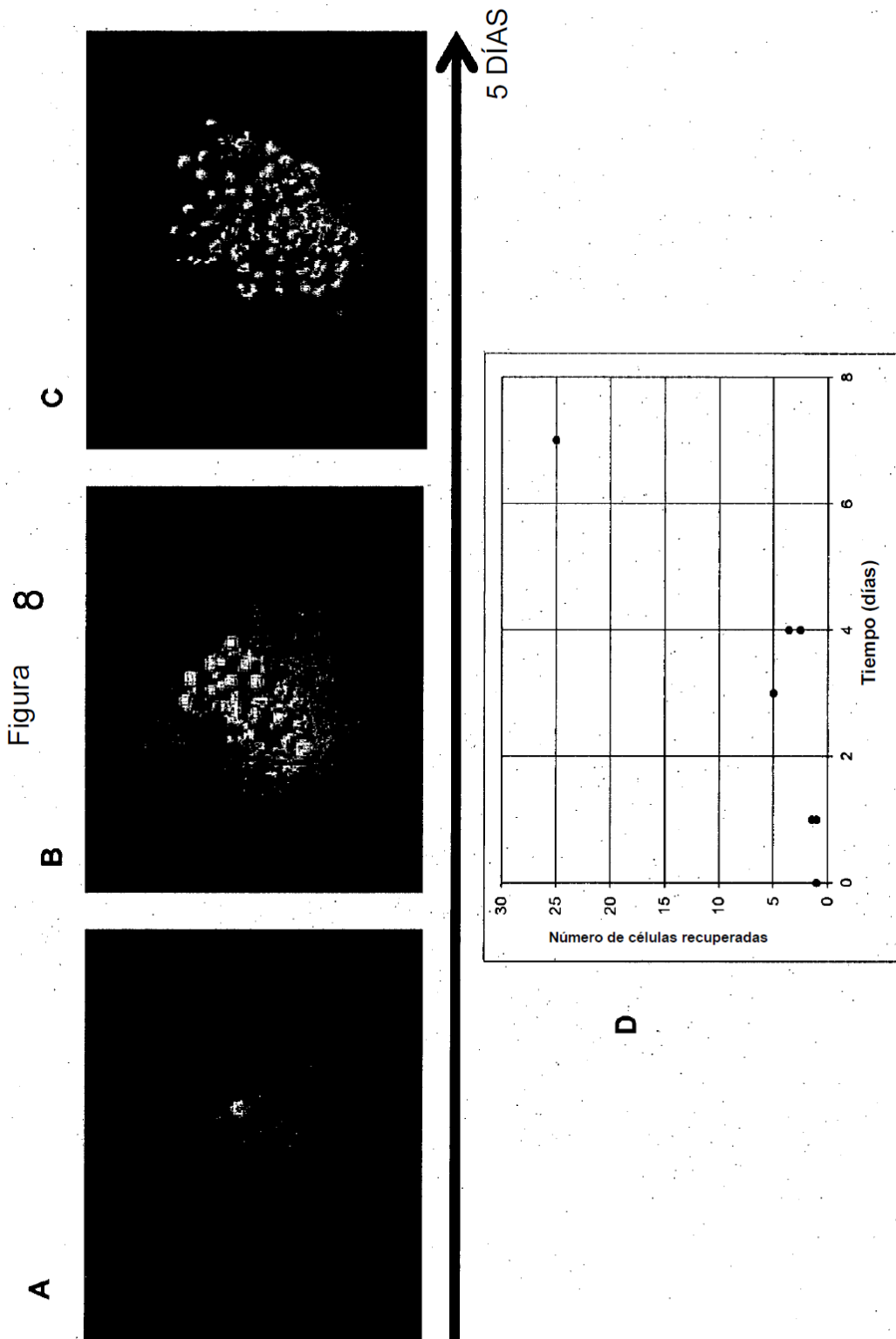


Figura 9

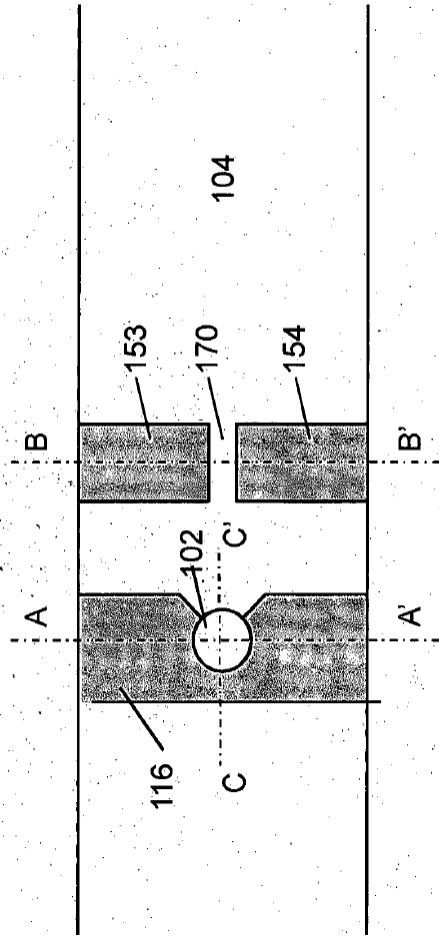


Figura 10

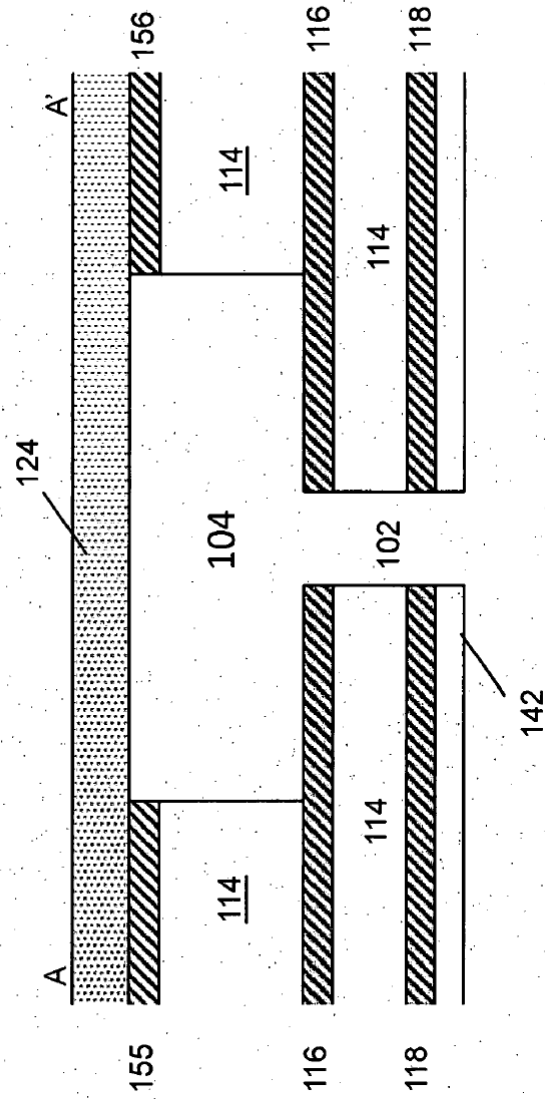


Figura 11

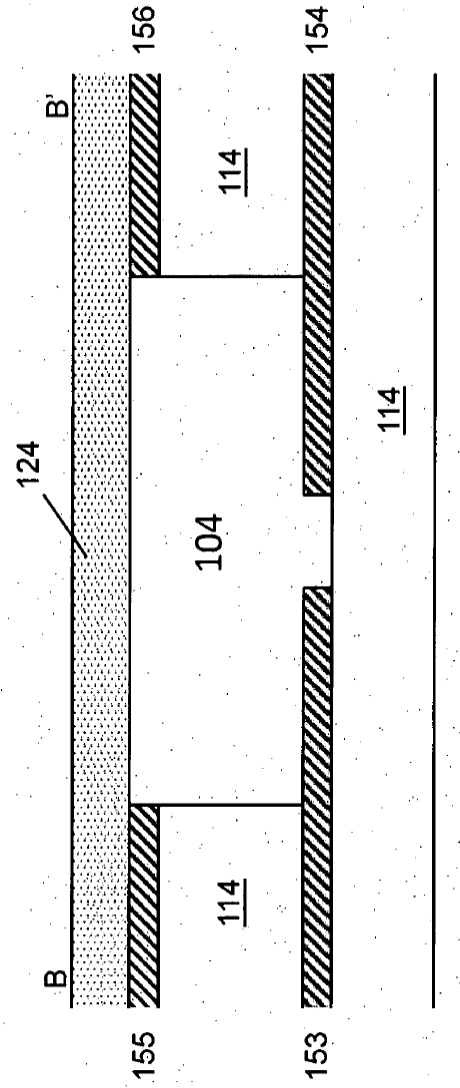
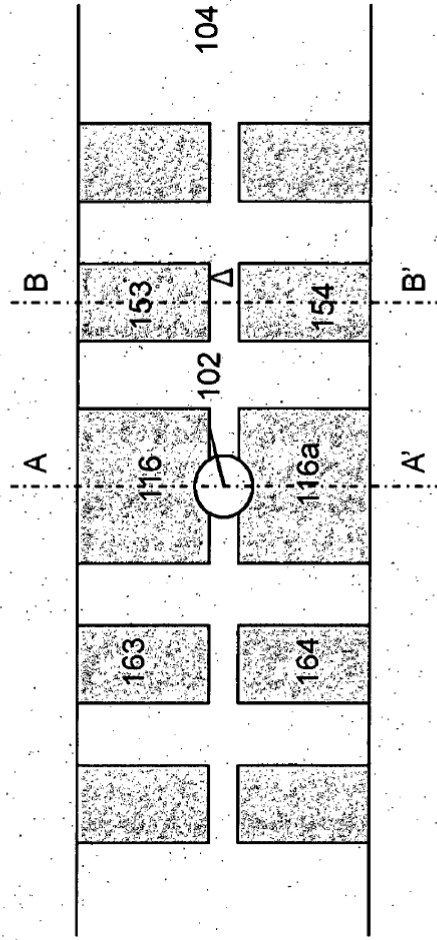


Figura 12



$\Delta = \text{mínimo}$ 170

Figura 13

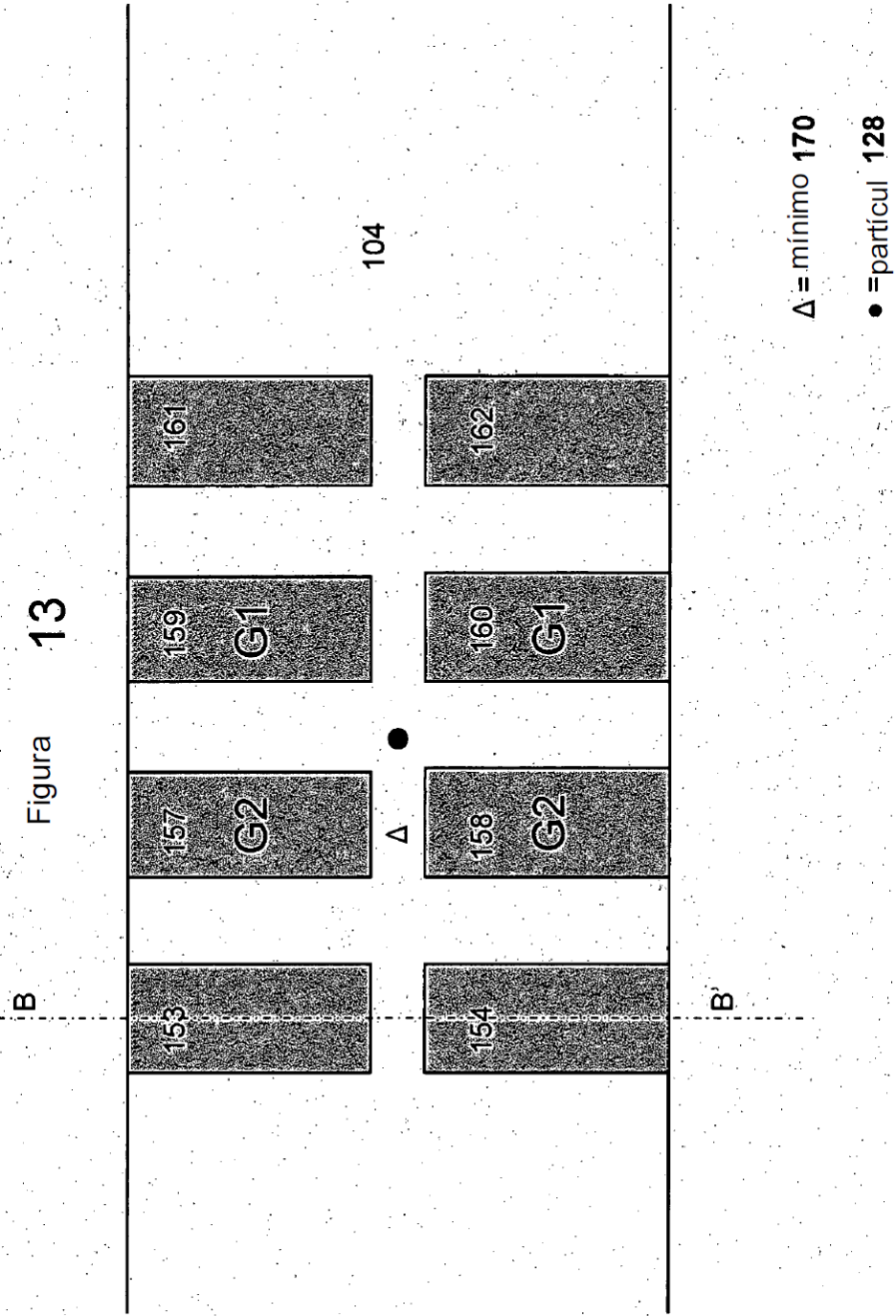


Figura 14

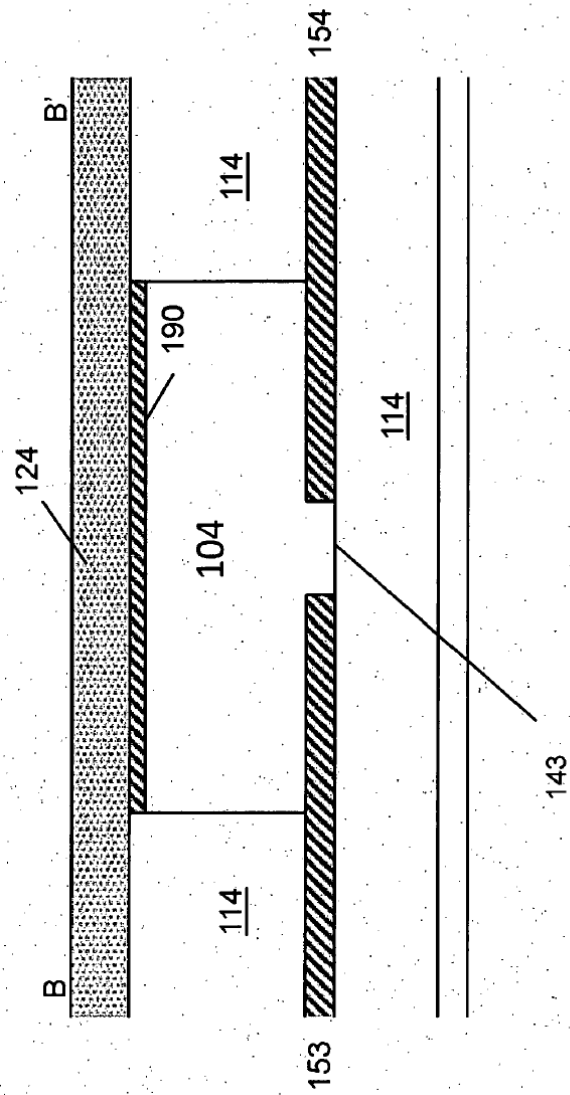


Figura 15

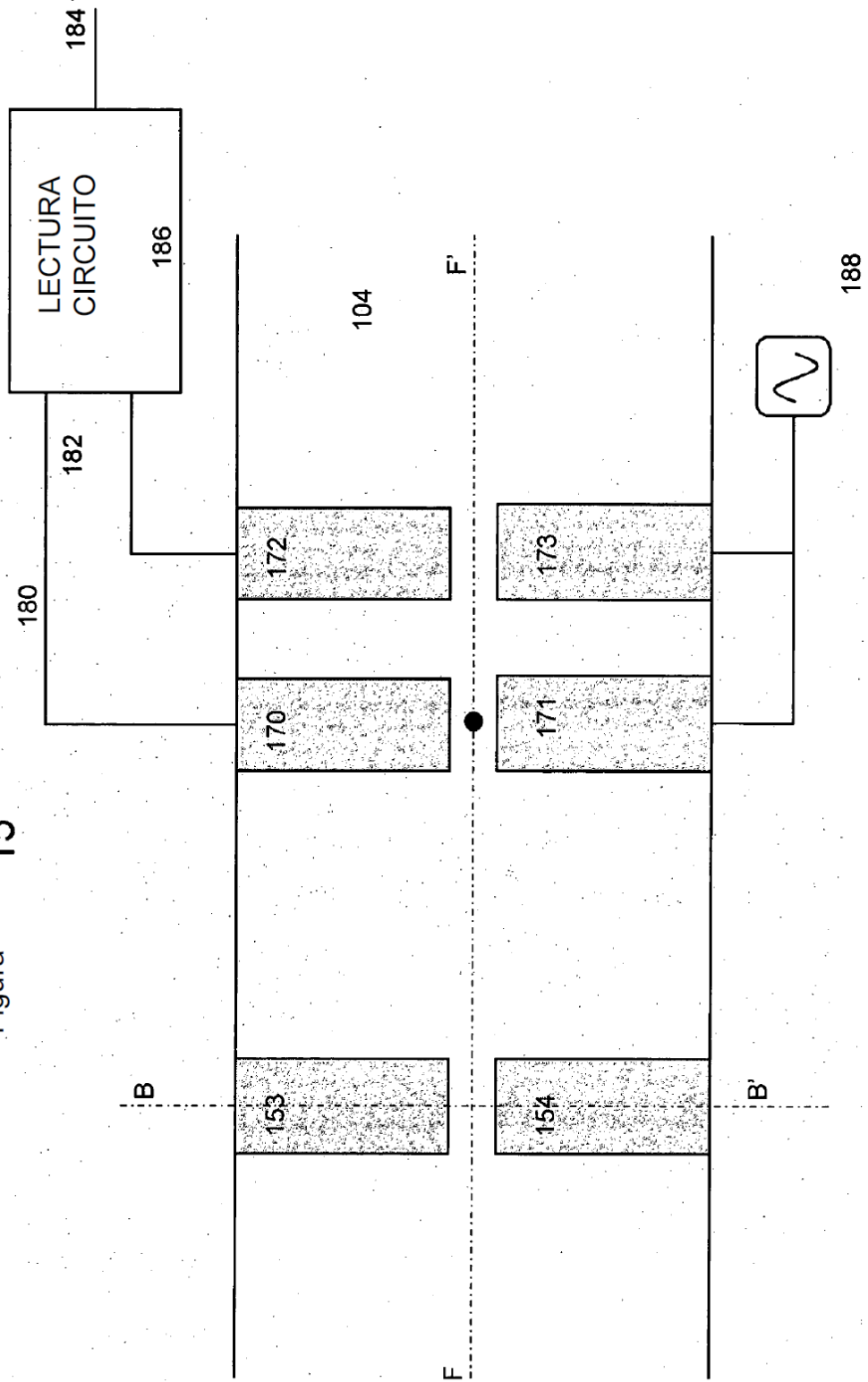


Figura 16

